

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Brucelose bovina: avaliação de testes sorológicos
após aplicação de levamisole**

ANA LÚCIA COELHO RECUERO

Pelotas, fevereiro de 2014.

ANA LÚCIA COELHO RECUERO

**Brucelose bovina: avaliação de testes sorológicos após aplicação de
levamisole**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientador: Prof. Dr. Claudiomar Soares Brod

Pelotas, fevereiro de 2014.

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F311b Recuero, Ana Lúcia Coelho

Brucelose bovina : avaliação de testes sorológicos após aplicação de levamisole / Ana Lúcia Coelho Recuero. – 114f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Veterinária preventiva. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2014. – Orientador Mário Carlos Araújo Meireles; co-orientador Claudiomar Soares Brod.

1.Veterinária. 2.Brucella. 3.Diagnóstico. 4.Falso positivo. 5.FPSR. 6.Bovinos. I.Meireles, Mário Carlos Araújo. II.Brod, Claudiomar Soares. III.Título.

ANA LÚCIA COELHO RECUERO

Brucelose bovina: avaliação de testes sorológicos após aplicação de levamisole

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Veterinária Preventiva.

APROVADA: 25 de Fevereiro de 2014

Prof. Dr. Carlos James Scaini

UFRG

Prof. Dr. Luís Felipe Damé Schuch

UFPeI

Profa. Dra. Helenice de Lima Gonzalez

UFPeI

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

UFPeI

**Para meu esposo Claudiomar,
nosso filho Abel e “in memoriam”
de meus pais José e Ricardina
com carinho e gratidão.
DEDICO ESTA TESE.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS pela graça da vida, pela presença nas alegrias e dificuldades, e pelo amor eterno.

A Nossa Senhora mãe de Jesus, pela proteção de seu Manto Azul, me lembrando de ter força, coragem e esperança sempre.

Sou grata ao meu esposo Claudiomar pela orientação e iniciação científica, pelo amor, dedicação, parceria e por ser o meu “Brodinho Querido”.

Ao meu filhote querido Abel, pela paciência e amor, que com sua pureza e bondade, iluminou a minha vida e me deu forças na batalha. A mamãe te ama muito, filhão!

Ao meu Orientador Dr. Mário Meireles, você é o cara!! Eu não poderia ter ganhado de Deus um orientador melhor!! A você, minha eterna gratidão!!

Sou muito grata à amizade de Renata Osório que me orientou, escutou, ajudou e deu muito carinho sempre, meu obrigadão!

A todos os meus irmãos, não esquecendo do Caco e Sandra (quantas vezes juntamos o gado?), Ciça, Zé, Carlinhos, Fefa, cada um deu uma parcela de amor e contributo nesta caminhada!

A minha amigona Helenice que desde o primeiro dia acreditou no meu trabalho, trabalhou lado à lado, orientou, e apoiou em toda caminhada da Tese!! Sou tua eterna FÃ !!

As minhas parceiras de coleta, Joana (meu braço direito e esquerdo às vezes), Helenice, Karine, Priscila, Amanda, Juca, Lourdes, Cláudia e todos aqueles colegas que ajudaram nas infundáveis coletas e processamento dos soros.

Meu agradecimento especial aos proprietários dos animais, que se dispuseram à esse extenso trabalho, com entusiasmo e perseverança. E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram na realização desta Tese.

À CAPES, agradeço por custear este período de pesquisa tão importante em minha vida.

“In Memoriam” de meus pais, a Rick aquela amorosa fortaleza alva e ao José personificação da bondade e retidão, agradeço de todo coração, terem feito de mim o que sou hoje! Amo vocês pra sempre, e sinto vossa falta!!

Finalmente, aos queridos animais, que tantas vezes deram o “sangue”, agradeço por serem dóceis, medrosos, obstinados, furiosos, mas o mais importante, é que a alma de vocês é pura e verdadeira. Por isso amo vocês!

O amor vence tudo!!

Chiara Lubich

Resumo

RECUERO, Ana Lúcia Coelho. **Brucelose bovina: avaliação de testes sorológicos após aplicação de levamisole** 2014. 114f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

O objetivo deste trabalho foi descrever reações sorológicas falso-positivas (FPSR) em um estudo com 989 bovinos sorologicamente negativos, provenientes de propriedades com e sem história de aborto por *brucella* spp, bem como avaliar as ligações entre alguns fatores individuais ou de rebanho e a ocorrência destes FPSR. Usou-se o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) em todos os animais e os bovinos reagentes ao AAT na primeira coleta de sangue, se confirmados pelos testes 2 Mercaptoetanol (2ME) e Fluorescência da Luz Polarizada (FPA) foram encaminhados ao abate sanitário. Os não reagentes no dia zero foram inoculados com Levamisole (782) e dois grupos controles (207) com solução fisiológica (100) e com Ivermectina (107). Os dois grupos controles foram negativos em todos os testes. O grupo Levamisole apresentou uma incidência global (I_r) de 1,41% de FPSR. O risco relativo (**RR**) de FPSR na primavera foi 23,42 vezes mais provável do que nas outras estações. A Fração Etiológica do Risco (**FER**) mostrou que 95,73% das FPSR ocorreram pela exposição ao levamisole mais o efeito primavera. A incidência de animais FPSR com Condição Corporal ruim (**CC_r**) foi 10,34% e nos com CC boa (**CC_b**) foi 1.06%. O **RR** de FPSR com **CC_r** foi 9,74 vezes mais provável do que nos **CC_b**. A **FER** mostrou que 89,73% dos FPSR ocorreram pela exposição ao levamisole mais a **CC_r**. A utilização do Levamisole como imunostimulante e anti-helmíntico permanece recomendada, entretanto, deve ser observado um período de carência de no mínimo 15 dias entre aplicação do medicamento e realização do diagnóstico para brucelose bovina

Palavras-chave: Brucella. Diagnóstico. Falso-positivo. FPSR. Bovinos.

Abstract

RECUERO, Ana Lúcia Coelho. **Brucelose bovina: avaliação de testes sorológicos após aplicação de levamisole** 2014. 114f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

The aim of this study was to describe false-positive serological reactions (FPSR) in a study of 989 serologically negative cattle from farms with and without a history of abortion *Brucella* spp, as well as evaluating the links between some individual or herd factors and the occurrence these FPSR. We use the test Buffered Acidified Antigen (AAT) in all animals and reagents in the AAT first blood sample, if confirmed by tests 2 Mercaptoethanol (2ME) and Fluorescence Polarization Assay (FPA) were referred to stamping. Non reagents were inoculated on day zero with Levamisole (782) and two control groups (207) with saline (100) and Ivermectin (107). The two control groups were negative in all tests. The levamisole group had an overall incidence (**I_r**) of 1.41 % of FPSR. The Relative Risk (**RR**) of FPSR spring was 23.42 times more likely than in other seasons. Fraction Etiologically Risk (**FER**) showed that 95.73 % of FPSR occurred by exposure to levamisole plus the spring effect. The incidence of animals with FPSR with Body Condition (**CC_r**) poor was 10.34 % and with good CC (**CC_b**) was 6.1 %. The **RR** of FPSR with **CC_r** was 9.74 times more likely than in **CC_b**. The **FER** showed that 89.73 % of FPSR occurred by exposure to levamisole more **CC_r**. The use of levamisole as an immunostimulant and anthelmintic remains recommended, however, a grace period of at least 15 days must be observed between application of the product and make the diagnosis for bovine brucellosis

Key words: *Brucella*. False-positive. FPSR. Cattle.

Lista de Tabelas

		página
TABELA 1	Análise sorológica para Brucelose de 782 fêmeas bovinas com mais de 24 meses, após tratamento com levamisole.....	29

Lista de Abreviaturas

- 2ME – Dois Mercaptoetanol
- AAT – Antígeno Acidificado Tamponado
- CC – Condição corporal dos animais
- CC_b – Condição corporal boa
- CC_r – Condição corporal ruim
- DR_p – Diferença de risco na população
- FA_e – Fração atribuível nos expostos
- FA_p – Fração atribuível populacional
- FER – Fração Etiológica de Risco
- FPA – Ensaio de Polarização da Fluorescência
- FPSR – Reações sorológicas falso-positivas
- GLEV1- Grupo levamisole 7,5%
- GLEV2 - Grupo levamisole 18,8%
- HB – Histórico de brucelose na propriedade
- IgG – Imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M
- I_T – Risco Absoluto
- MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- p-Fisher – valor de p no teste de Fisher
- PMN – Polimorfos Nucleares
- p-Yates – valor de p no teste de Yates
- R_{ne} – Risco Absoluto nos não expostos
- RR – Risco Relativo

Sumário

1.	Introdução	14
2.	Objetivos	16
3.	Artigos	17
	3.1. Artigo 1. Brucelose bovina: avaliação de testes sorológicos após aplicação de Levamisole	17
	Abstract	18
	Resumo	19
	Introdução	20
	Materiais e Métodos	23
	Resultados	27
	Discussão	30
	Conclusão	33
	Agradecimentos	34
	Bibliografia	35
	3.2. Artigo 2. Da <i>Brucella melitensis</i> à <i>Brucella inopinata</i>	38
	Resumo	38
	Summary	39
	Histórico	40
	Importância	45
	Etiologia	47
	Sobrevivência do Agente no Hospedeiro	59
	Sobrevivência do Agente no Ambiente	63
	Epidemiologia	65
	Sinais Clínicos	70
	Patogenia	72
	Diagnóstico	76
	Tratamento Humano	81
	Tratamento Animal	83
	Vacinação	84
	Prevenção e Controle	88
	Conclusão	90
	Bibliografia	93
4.	Conclusão Geral	108
	Anexos	112

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Brucella* sobreviveu 107 anos, desde a descoberta do *micrococcus melitensis* no homem por David Bruce em 1887 até a descoberta da *B. canis* em caninos por Carmichael em 1968 nos Estados Unidos, com apenas seis espécies conhecidas. A partir de 1994 até o ano de 2010, se passaram apenas 16 anos e foram descobertas oficialmente mais quatro novas espécies. Todas essas dez espécies com nomes válidos são altamente relacionadas umas com as outras. Uma vasta gama de espécies animais está ultimamente sendo implicada como portadores de uma série de novas, ainda não descritas, espécies de *Brucella* e, apesar dos avanços recentes, os determinantes moleculares e os mecanismos de virulência da *Brucella* só estão apenas começando a ser compreendidos, sendo premente uma revisão mais atualizada.

É sabido que dentro da margem de sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico para a brucelose, podem ocorrer reações falso-positivas e/ou falso-negativas.

A sensibilidade de um teste de diagnóstico é a capacidade do mesmo apresentar um resultado positivo quando o indivíduo testado possui a doença em estudo. Se novas espécies de *Brucella* estão recentemente sendo descobertas, é possível que os testes que utilizam antígenos velhos, não apresentem sensibilidade suficiente para a sua detecção, permanecendo então na população indivíduos falso-negativos.

A especificidade de um teste de diagnóstico é a capacidade do mesmo apresentar um resultado negativo quando o indivíduo testado não possui a doença em estudo. Se o teste acusar uma reação positiva para indivíduos sem a doença, ocorrerá o que chamamos de falso-positivo. Dois fatores são citados como importantes causas de reações falso-positivas, frequentemente denominadas pela sigla inglesa de “FPSR” (false positive serological reaction), sendo eles a presença de anticorpos inespecíficos presentes nas infecções por outras bactérias, ou ainda, decorrentes do resultado de vacinação com B19 após a idade recomendada.

A rotina de diagnóstico de Brucelose Bovina levanta suspeita de animais FPSR pela aplicação de antiparasitários, cujos dados científicos não estão comprovados ou disponíveis. A comprovação da interferência de medicamentos antiparasitários ou imunoestimulantes em imunodiagnóstico para Brucelose é fundamental na distinção de animais verdadeiros positivos de verdadeiros negativos nos testes diagnósticos. Portanto faz-se necessário, o acompanhamento de animais sorologicamente negativos à Brucelose, seguidos em uma coorte e avaliados por pelo menos 21 dias após aplicação de antiparasitário imunoestimulante para verificar uma terceira provável causa de animais FPSR.

Parafrazeando Epíctetus, século II dC, as aparências para a mente humana são de quatro tipos: As coisas ou são o que parecem ser (verdadeiro positivo), ou não são, mas mesmo assim parecem ser (falso positivo), ou são e não parecem ser (falso negativo), ou não são e nem parecem ser (verdadeiro negativo). Decidir corretamente sobre cada uma destas alternativas é a tarefa do homem sábio.

Portanto, uma revisão atualizada, principalmente no tocante à etiologia, patogenia e epidemiologia da Brucelose, bem como da interferência ou não de medicamentos antiparasitários no imunodiagnóstico de Brucelose é fundamental na detecção de animais verdadeiros positivos e verdadeiros negativos nos testes diagnósticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o aparecimento de reações sorológicas falso-positivas (FPSR) em testes de diagnóstico para Brucelose, decorrente de aplicação do antiparasitário imunomodulador levamisole.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a concentração do levamisole como responsável por FPSR nos testes de triagem e confirmatórios referenciados pelo MAPA para Brucelose Bovina.
2. Evitar perdas econômicas pelo abate de animais falso-positivos.
3. Avaliar características individuais, de rebanho e a sazonalidade, quanto ao aparecimento de FPSR após administração de levamisole.

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1

Brucelose bovina: avaliação de testes sorológicos após aplicação de Levamisole

Bovine brucellosis: evaluation of serological tests after application of Levamisole

Ana LC Recuero^{1*}, Helenice L Gonzales^{2*}, Karine M Foster^{3*}, Cláudia P Hartleben^{3*}, Denise G Dias^{4*}, Juliana C Hernandez^{4*}, Lourdes C Hirshman^{4*}, Renata O Faria^{2*}, Claudiomar S Brod^{2,4*§}, Mário CA Meireles^{2*}.

¹ Doctoral Postgraduate Course in Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, University Campus Capão do Leão, Building N° 42, Pelotas, RS, Brazil.

² Department of Veterinary Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, University Campus Capão do Leão, Building N° 1, Pelotas, RS, Brazil

³ Technology Development Center (CDTEC), University Campus Capão do Leão, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

⁴ Zoonosis Control Center (CCZ), Department of Preventive Veterinary, College of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, Building N° 42, Pelotas, RS, Brazil.

Submetido à revista [Brazilian Journal of Microbiology](#)

Abstract

Background

Since 2005, possibly false-positive serological reactions (FPSR) due to the use of antiparasitic drugs in the screening of bovine brucellosis were reported by some field veterinary in our laboratory. The aim of this work was to describe this phenomenon in a study of 989 serologically negative cattle from farms with and without a history of abortion Brucella, as well as evaluating the links between some individual or herd factors and the occurrence of these FPSR.

Results

We use the screening with acidified buffered antigen (AAT) in the sera of all animals. Those reagents to the AAT in the first blood collection (day zero) if confirmed by tests 2 Mercaptoethanol (2ME) and the Fluorescence Polarization Assay (FPA) were sent to sanitary slaughter according to the legislation of the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Bovine Tuberculosis (PNCEBT). The non-reacting animals were inoculated on day zero with Levamisole (782) and two control groups (207) with saline (100) and Ivermectin (107). The blood was collected again on days 7, 14 and 21 post inoculations and analyzed according to the standards PNCEBT. The two control groups were negative in all tests. Levamisole group had an overall incidence of 1.41% of FPSR, all only react on day seven. The incidence, risk in exposed (**Re**), of animals with FPSR in spring was 4.27% and in the other seasons was 0.18%. The relative risk (**RR**) of finding animals FPSR in spring was 23.42 times more likely than in other seasons. The Risk Etiological Fraction (**FER**) showed that 95.73 % of FPSR occurred by exposure to levamisole plus the modifier variable spring effect. The incidence of animals with FPSR with poor body condition (**CC_r**) was 10.34% and with good (**CC_b**) was 1.06%. The **RR** of finding FPSR animals with **CC_r** was 9.74 times more likely than in animals with **CC_b**. The **FER** showed that 89.73 % of FPSR occurred by exposure to levamisole more **CC_r**.

Conclusions

The use of levamisole as an immunostimulant and anthelmintic remains recommended, however, a grace period of at least 15 days must be observed between application of the product and make the diagnosis for bovine brucellosis

Key words: Brucella. Diagnosis. False-positive. FPSR. Cattle. levamisole

RESUMO

Pano de fundo

Desde 2005, eventualmente, reações sorológicas falso-positivas (FPSR), devido ao uso de antiparasitários, na triagem de brucelose bovina, eram relatadas por alguns veterinários de campo em nosso laboratório de diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi descrever esse fenômeno em um estudo com 989 bovinos sorologicamente negativos, provenientes de propriedades com e sem história de aborto por brucella, bem como avaliar as ligações entre alguns fatores individuais ou de rebanho e a ocorrência destes FPSR.

Resultados

Usou-se o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) em todos os animais e os não reagentes no dia zero foram inoculados com levamisole (782) e dois grupos controles (207) com solução fisiológica (100) e com ivermectina (107). Os dois grupos controles foram negativos em todos os testes. O grupo levamisole apresentou uma incidência global (Ir) de 1,41% de FPSR. O risco relativo (**RR**) de FPSR na primavera foi 23,42 vezes mais provável do que nas outras estações. A Fração Etiológica do Risco (**FER**) mostrou que 95,73% das FPSR ocorreram pela exposição ao levamisole mais o efeito primavera. A incidência de animais FPSR com Condição Corporal ruim (**CC_r**) foi 10,34% e nos com CC boa (**CC_b**) foi 1,06%. O **RR** de FPSR com **CC_r** foi 9,74 vezes mais provável do que nos **CC_b**. A **FER** mostrou que 89,73% dos FPSR ocorreram pela exposição ao levamisole mais a **CC_r**.

Conclusão

A utilização do levamisole como imunoestimulante e anti-helmíntico permanece recomendada, entretanto, deve ser observado um período de carência de no mínimo 15 dias entre aplicação do medicamento e realização do diagnóstico para brucelose bovina

Palavras chave: Brucella. Diagnóstico. Falso-positivo. FPSR. Bovinos. levamisole

INTRODUÇÃO

A Brucelose é uma zoonose de importância em saúde pública e animal, tendo vários efeitos negativos na reprodução e produção de bovinos, afetando moral e fisicamente os humanos. A transmissão da *brucella* spp se dá através de líquidos corporais, onde ocorre a liberação de um grande número de bactérias, sendo assim os produtos de origem animal, são passíveis de transmitir o agente da doença aos homens se não forem corretamente processados. Nos animais, a enfermidade, pode perdurar toda a vida se não detectada, tornando-os fonte de infecção permanente da doença (XAVIER, 2009; OIE, 2013).

A enfermidade da Febre Ondulante é conhecida desde 450 aC, já descrita por Hipócrates em seu “Corpus Médico”, como doença de remissão e recorrência periódica (CURATE, 2004). Apontada como uma doença comprovadamente tão antiga, conseguiu perpetuar-se entre os homens e animais até a atualidade (PAPAS *et al*, 2006), em detrimento da comunicação global, dos avanços culturais e científicos, como o advento da Pasteurização, que foi um importante avanço na qualidade dos alimentos (OIE, 2013).

Tratando-se de Brucelose, por apresentar caráter zoonótico, a identificação e a eliminação das fontes de infecção são de primordial importância, pois desta forma o bloqueio da transmissão aos homens e animais susceptíveis pode ser realizado de forma efetiva (NIELSEN, 1990).

No Brasil o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) apresentado em 2001, e em andamento desde 2003, tem direcionado o diagnóstico, padronizando as técnicas e atividades para garantir o efetivo sucesso do programa, priorizando a saúde humana e animal e o crescimento da pecuária nacional. (BRASIL, 2001).

Os testes sorológicos indicados para rotina de diagnóstico pelo PNCEBT são o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), utilizado como teste de triagem, e o teste da Prova Lenta em Tubos conjuntamente com o Teste do 2 Mercaptoetanol (2ME), utilizado como teste confirmatório. O abate sanitário dos animais confirmados reagentes e a notificação ao PNCEBT são obrigatórios e integram os requisitos do programa (BRASIL, 2006). A inclusão da sorologia em aprovação como confirmatória para diagnosticar Brucelose, nominada Ensaio de Polarização Fluorescente (FPA) em breve em utilização pelo programa, torna-se imprescindível para enriquecer o presente estudo.

Um programa de erradicação da brucelose bovina é fortemente prejudicado pela presença de reações sorológicas falso positiva (FPSR) que poderão ocorrer com *Vibrio cholerae* O1, *Escherichia coli* O:157, algumas cepas de *Escherichia hermanni* e *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella* grupo N (O:30), e *Yersinia enterocolitica* O:9, mas somente *Yersinia enterocolitica* O:9 é uma significativa causa de reações sorológicas falso-positivas (FPSR) no diagnóstico da brucelose bovina, como afirmaram Gerbier *et al.*, em 1997.

A imunidade ativa ou antígeno-específica, e a imunidade passiva antígeno-independente atuam no controle das infecções animais, e fazem parte do sistema imune específico e resultam na imunidade celular e humoral. Opostamente à imunidade, a proteção inespecífica contra agentes invasores, ou seja, o mecanismo de defesa não-imune é chamado paraimunidade (CASTRUCCI, 1994), não mediado por células de memória, mas, podendo ocorrer sob condições naturais, ou artificiais utilizando-se imunoestimuladores (TIZARD, 2002). As células envolvidas na paraimunidade são os macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares, células Natural Killer, e fatores humorais como, interleucinas, interferon e o fator de necrose tumoral, que agem principalmente em fases precoces das infecções (CASTRUCCI, 2000).

A carência nutricional aliada ao manejo inadequado e condições climáticas adversas, tem contribuído para o aumento da taxa de mortalidade de animais adultos e diminuição da taxa de natalidade. Tais fatores, geralmente induzem a situações estressantes, que podem evoluir para distúrbios de natureza endógena (WAGHORN, 2003). Assim sendo, o sistema imunológico se mostra vulnerável a essa situação, podendo resultar numa condição de imunodepressão. O interesse, pela restauração e pelo fortalecimento da resposta imunitária, em diferentes momentos, estimulou vários estudos com diversas substâncias de origem animal, vegetal ou sintética (RAMON, 1925; DREWS, 1984; VANSELOW, 1987).

O Levamisole é um fármaco imunoestimulante sintético derivado do “phenylimidotiasole”, que é usado como um anti-helmíntico contra nematódeos (KAYAALP, 1998). O efeito do Levamisole sobre as células do sistema imune, principalmente linfócitos T, monócitos e neutrófilos, parece ser mais evidente em pacientes em condições de imunodepressão (ROITH, 1984). Apesar das contradições quanto às informações técnicas no uso clínico do Levamisole como suporte terapêutico, algumas aplicações têm sido relatadas, incluindo tratamento contra diversas afecções em humanos, inclusive em acometidos por *Brucella* spp (THORNES, 1977, MOLIFE & HANCOCK, 2002). O uso de imunoestimuladores em medicina humana para o tratamento de neoplasias, asma, artrite,

enfermidades inflamatórias e imunossupressão, é amplamente realizado com sucesso atualmente (TIZARD, 2002, CASTRUCCI, 1994).

O Levamisole é um produto confeccionado à base de Cloridrato de Levamisol 7,5% ou Fosfato de Levamisol 18,8% e tem garantia do fornecedor **Zoetis Brasil**, uma unidade de negócios de **Saúde Animal da Pfizer®**, como fármaco de ação anti-helmíntica e também conhecido e anunciado em sua bula como imunoestimulante inespecífico, sendo utilizado em medicina veterinária e humana com este fim, obtendo sucesso em diversos tratamentos médicos (RODRIGUES *et al.*, 2005). A dupla aptidão do medicamento é reconhecida no meio profissional e científico, porém o seu efeito imunoestimulante está condicionado ao estado de imunodepressão do paciente, mais facilmente detectável em humanos que em rotina animal (ROITH, 1984, RODRIGUES *et al.*, 2005).

A rotina de diagnóstico de Brucelose Bovina levanta suspeita de animais FPSR, cujos dados científicos não estão comprovados ou disponíveis. A comprovação da interferência de medicamentos antiparasitários ou imunoestimulantes em imunodiagnóstico de triagem e confirmatório para Brucelose é fundamental na distinção de animais verdadeiros positivos de verdadeiros negativos nos testes diagnósticos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade de FPSR em testes de diagnóstico para Brucelose, decorrente da aplicação do antiparasitário imunoestimulante, Levamisole, em duas apresentações comerciais injetáveis, 7,5% e 18,8%, em bovinos de corte e de leite no Extremo Sul do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Realizou-se um estudo epidemiológico de coorte onde se avaliou 782 animais, dos quais 164 provenientes de propriedades sem histórico de aborto brucélico e 618 de propriedades com histórico de aborto brucélico, através de sorologia para brucelose segundo PNCEBT.

As propriedades consideradas Sem Histórico de Brucelose (SHB) enquadravam-se no padrão de não ocorrência de casos da doença, em avaliações periódicas a partir do ano de 2010 e as propriedades Com Histórico de Brucelose (CHB), enquadravam-se no padrão de ocorrência de no mínimo um caso de brucelose em avaliações periódicas a partir do ano de 2010.

A realização dos testes preconizava a idade de 24 meses ou mais para fêmeas adultas, vacinadas entre três a oito meses de idade, comprovadamente não reagentes ao AAT no primeiro teste realizado como triagem. Tanto animais de corte como leiteiros foram testados e avaliados. No presente estudo, foram utilizados 2 grupos controle e 2 grupos para análise de animais tratados com levamisole 7,5% e 18,8%.

A aplicação do antiparasitário foi vinculada ao período de no mínimo 45 dias, após a aplicação de outros antiparasitários, previamente acordado com os produtores. No dia inicial do estudo em cada propriedade, primeiramente foi coletado o sangue dos animais e na sequência aplicado o anti-helmíntico, conforme recomendação do fabricante.

Grupos Estudados

O primeiro dia de coleta de sangue dos animais foi denominado dia zero. Na sequência, em todos os grupos, precederam-se novas coletas nos dias 7, 14 e 21 para as análises.

Grupo Controle 1 (GC1): No dia zero do estudo, os animais do GC1 foram tratados com Soro Fisiológico (1 mL/40 Kg de peso vivo), após a coleta de sangue para sorologia de triagem com AAT. Foram coletados e tratados 100 animais.

Grupo Controle 2 (GC2) No dia zero do estudo os animais do GC2 foram tratados com Ivermectina (1 mL/50 Kg) de peso vivo, após a coleta de sangue para sorologia de triagem com AAT. Foram coletados e tratados 107 animais.

Grupo Levamisole 1 (GLEV1): Os animais foram tratados após coleta de sangue no dia zero, com Levamisole 7,5% (1 mL para cada 40 kg de peso vivo) e recoletados nos dias 7, 14, e 21 para acompanhamento sorológico. Foram coletados e tratados 305 animais.

Grupo Levamisole 2 (GLEV2): Os animais foram tratados após coleta de sangue no dia zero, com Levamisole 18,8% (1 mL para cada 40 kg de peso vivo) e recoletados nos dias 7, 14, e 21 para acompanhamento sorológico. Foram coletados e tratados 477 animais.

O número de animais estimados pelo programa EpiInfo 6.04 contempla os 207 animais divididos em dois grupos um de 100 outro de 107 animais como controles distintos e 782 animais analisados utilizando-se o imunostimulador Levamisole com formulação à base de Cloridrato de Levamisole. Segundo EpiInfo 6.04 (DEAN *et al.* 1994), para detectar uma prevalência de 1,5%, com um erro absoluto de 0.5% em uma população de tamanho indeterminado, com 95% de confiança deveríamos coletar amostras sanguíneas de pelo menos 567 animais e com 99% de confiança, 979 animais.

Coleta das Amostras

As amostras de sangue foram coletadas utilizando-se material estéril, em tubos de hemólise com vácuo e agulhas de calibre 27:8, e transportadas em caixas isotérmicas ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Universidade Federal de Pelotas, RS. A separação do soro sanguíneo foi realizada por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, sendo o soro identificado e armazenado em microtubos para congelamento de 2 mL à -20°C até seu processamento subsequente. Quatro amostras de todos os grupos foram coletadas e analisadas no dia zero, dia 7, dia 14, e dia 21 para avaliação de aparecimento de FPSR.

Sorologia Realizada

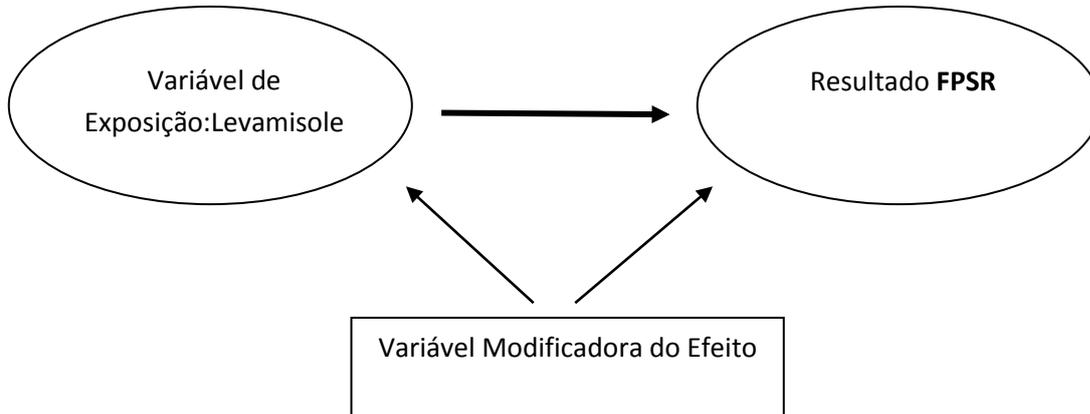
A sorologia utilizada no presente estudo foi baseada nas normas do PNCEBT (BRASIL, 2006) e sua execução foi realizada conforme o Manual Técnico do programa.

O teste de triagem AAT foi realizado nos soros dos animais de todos os grupos. Os animais reagentes ao AAT nesta primeira coleta de sangue (dia zero) se confirmados pelo 2ME e pelo FPA foram encaminhados ao abate sanitário, conforme legislação do PNCEBT.

Os animais reagentes ao AAT nos dias 7, ou 14 ou 21 e negativos no dia zero, foram avaliados com 2ME e FPA, se não reagentes foram classificados como FPSR.

Análise Estatística

A aplicação do questionário epidemiológico realizada no dia zero reuniu os dados epidemiológicos que somado aos resultados, foram analisados pelo programa EpiInfo versão 6.04 (DEAM *et al.*, 1994). As medidas de efeito foram avaliadas conforme desenho abaixo:



As medidas de efeito foram avaliadas através da tabela de contingência:

Variável modificadora do efeito	FPSR		Total
	Presente	Ausente	
Presente	a	b	a+b
Ausente	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

1. Risco absoluto nos Expostos (R_e): É a probabilidade de um evento ocorrer em uma população exposta a um determinado fator de risco. É a incidência do fator de risco (FR) em um grupo exposto, inicialmente livre dele.

$$R_e = \frac{a}{a+b} \times 100$$

2. Risco absoluto nos não Expostos (R_{ne}): É a probabilidade de um evento ocorrer em uma população não exposta a um determinado fator de risco. É a incidência do fator de risco (FR) em um grupo não exposto, inicialmente livre dele.

$$R_{ne} = \frac{c}{c+d} \times 100$$

3. Risco Absoluto (I_T): É a probabilidade de um evento ocorrer em uma população sob estudo. É a incidência total do fator de risco (FR) em um grupo inicialmente livre dele.

$$I_T = \frac{(a+c)}{N} \times 100$$

4. Risco Relativo (RR): É a razão entre a incidência em indivíduos expostos a determinado fator de risco e a incidência em indivíduos não expostos. Quantas vezes mais provável dos indivíduos expostos apresentarem a doença do que os indivíduos não expostos.

$$RR = \frac{\frac{a}{a+b}}{\frac{c}{c+d}}$$

5. Risco Atribuível (RA – diferença de risco): É a diferença de risco entre os expostos e os não expostos. É a incidência adicional do evento após a exposição além daquela experimentada pelos indivíduos que não foram expostos.

$$RA = \frac{a}{a+b} - \frac{c}{c+d}$$

6. Fração Atribuível nos expostos (FAe) ou Fração Etiológica de Risco (FER): é a proporção do RA pelo Re, expressa como uma porcentagem. Ela representa a proporção de falso-positivos entre os expostos que é atribuível à exposição.

$$FA_e = \frac{\left(\frac{a}{a+b} - \frac{c}{c+d}\right)}{\left(\frac{a}{a+b}\right)} \times 100$$

7. Diferença de Risco na população (DRp): é o risco no grupo exposto menos o risco na população total, incluindo os indivíduos não expostos bem como aqueles expostos a um determinado fator de risco. Ela representa o excesso de falso-positivos no total da população de expostos e não expostos que é atribuível à exposição.

$$DRp = \frac{(a+c)}{N - Rne}$$

8. Fração Atribuível na população (FAp): É a proporção da diferença de risco na população sobre a proporção de falso-positivos na população. Ela representa a proporção de falso-positivos na população que é atribuível à exposição. Esta medida ajuda a determinar qual exposição tem mais relevância para a saúde da população.

A fração atribuível populacional (FAp) é uma medida capaz de mensurar o efeito da eliminação do fator de risco para determinado desfecho, ou seja, mede o quanto a ocorrência do desfecho pode ser diminuída se o fator de risco fosse eliminado. A FAp, portanto, facilita a formulação de diversas estratégias preventivas na área da saúde pública.

$$FAp = \left(\frac{DRp}{\frac{a+c}{N}} \right) \times 100$$

RESULTADOS

Ao término do estudo, dos 989 animais coletados, 100 animais testados para imunomodulação aparente no Teste AAT, tratados com soro fisiológico no dia zero, obtiveram resultados negativos nos testes. Os 107 animais testados para imunomodulação aparente no Teste AAT, tratados com Ivermectina no dia zero, obtiveram resultados negativos nos testes. Estes dois grupos controle foram caracterizados como GC1 e GC2 respectivamente. No grupo levamisole (GLEV1 e GLEV2) ocorreram reações positivas no AAT somente na coleta do dia sete.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, o risco absoluto (**IR**) do aparecimento de FPSR pela administração de levamisole foi de 1,41% (11/782), entretanto, como as causas do aparecimento de um evento quase nunca são únicas, quando se avaliou prováveis variáveis modificadoras do evento se encontrou diferenças significativas.

Em relação às estações do ano (EA) em que os animais foram coletados e inoculados com levamisole, ocorreram 10 animais FPSR na primavera e 1 animal FPSR no inverno. A incidência de animais com FPSR na primavera (**Re**) foi de 4,27% e nas outras estações do ano (**Rne**) foi de 0,18%. O **RR** de encontrar animais FPSR na primavera foi 23,42 vezes mais provável do que em outras estações do ano, com um valor de $p < 0.0001$ e um valor de Fisher bi-caudal com $p = 0.000041$. O **RA** de encontrar animais FPSR na primavera é de 4,09%. A **FAe** ou FER é de 95,73%, ou seja, 95,73% dos FPSR ocorreram pela exposição ao levamisole mais a variável modificadora do efeito primavera. A **DRp** foi de 1,22, ou seja, o excesso de FPSR na população total atribuível à primavera. A **FAp** de 87,03% mostra o efeito da eliminação do fator de risco para FPSR, ou seja, mede o quanto a ocorrência de FPSR pode ser diminuída se não fosse realizada avaliação sorológica para brucelose na primavera, até uma semana após aplicação de levamisole.

Em relação à condição corporal (CC) dos animais coletados e inoculados com levamisole, ocorreram 03/29 animais FPSR com CC ruim e 8/753 animais FPSR com CC boa. A incidência de animais com FPSR com CC ruim (**Re**) foi de 10,34% e com CC boa (**Rne**) foi de 1.06%. O **RR** de encontrar animais FPSR com CC ruim foi 9,74 vezes mais provável do que em animais com CC boa, com um valor de $p < 0.001$ pelo teste de Yates e um valor de Fisher bi-caudal com $p = 0.006$. O **RA** de encontrar animais FPSR com CC ruim é de 9,28%.

A **FAe** ou FER é de 89,73%, ou seja, 89,73% dos FPSR ocorreram pelo exposição ao levamisole mais a variável modificadora do efeito CC ruim. A **DRp** foi de 0,34, ou seja, o excesso de FPSR na população total atribuível à CC ruim. A **FAp** de 24,47% mostra o efeito da eliminação do fator de risco para FPSR, ou seja, mede o quanto a ocorrência de FPSR pode ser diminuída se não fosse realizada avaliação sorológica para brucelose em animais com CC ruim, até uma semana após aplicação de levamisole.

Quando da comparação da concentração do levamisole, a incidência de FPSR no grupo GLEV2 (18,8%) foi de 1,89%, enquanto que no GLEV1 (7,5%) foi de 0,66%; o RR de GLEV2 em relação a GLEV1 foi de 2,88, entretanto o valor de $p = 0,22$ pelo teste de Yates e o valor de Fisher bi-caudal com $p = 0,27$ não mostrou diferença estatística significativa, ou seja, a concentração diferente do imunomodulador não influenciou no maior ou menor aparecimento de FPSR.

Os resultados ocorridos em propriedades SHB foram em número de 2 FPSR. Em contrapartida o número de animais FPSR encontrados nas propriedades CHB foi de 9 animais. A incidência de FPSR em propriedades CHB foi de 1,46% enquanto que nas SHB foi de 1,22%; o RR de CHB em relação à SHB foi de 1,19, entretanto o valor de $p = 0,81$ pelo teste de Yates e o valor de Fisher bi-caudal com $p = 1$ não mostrou diferença estatística significativa, ou seja, o histórico de brucelose na propriedade não influenciou no maior ou menor aparecimento de FPSR.

Tabela 01. Análise sorológica para Brucelose de 782 fêmeas bovinas com mais de 24 meses, após tratamento com Levamisole.

Ítem	FPSR-AAT		Total	R _e	R _{ne}	I _T	RR	RA	FA _e	DR _p	FA _p	p Yates	p Fisher
EA	Pos	Neg											
Primavera	10	224	234	4.27		1.41	23.4	4.09	95.73	1.2	87.03	<0.001	<0.001
Outras	1	547	548		0.18								
CL	FPSR-AAT												
GLEV2	9	468	477	1.89		1.41	2.88	1.23	62.25	0.75	53.8	0.27	0.22
GLEV1	2	303	305		0.66								
CC	FPSR-AAT												
Ruim	3	26	29	10.34		1.41	9.74	9.28	89.73	0.34	24.47	<0.001	0.006
Boa	8	745	753		1.06								
HB	FPSR-AAT												
Sim	9	609	618	1.46		1.41	1.19	0.24	16.26	0.19	13.3	0.81	1.0
Não	2	162	164		1.22								
FPSR-AAT	2 ME												
Positivos	0	11	11										
Negativos	0	0	0										
FPSR-AAT	FPA												
Positivos	0	11	11										
Negativos	0	0	0										

FPSR-AAT – Reações sorológicas falso positivas no teste do Antígeno Acidificado Tamponado; EA – Estação do Ano; CL – Concentração Levamisole; GLEV1 – Grupo Levamisole 7.5%; GLEV2 – Grupo Levamisole 18.8%; CC – Condição Corporal dos Animais; HB – Histórico de brucelose na propriedade; 2ME – teste do 2 Mercaptoetanol; FPA – Ensaio de Polarização Fluorescente; R_e - Risco absoluto nos expostos; R_{ne} – Risco absoluto nos não expostos; I_T - Risco absoluto; RR – Risco Relativo; FA_e – Fração atribuível nos expostos; DR_p – Diferença de risco na população; FA_p – Fração atribuível populacional; p-Yates – valor de p no teste de Yates; p-Fisher – valor de p no teste de Fisher.

DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi o de atender às necessidades de veterinários de campo que alegavam existirem FPSR para brucelose em animais tratados com antiparasitários. Este trabalho é o primeiro estudo epidemiológico prospectivo sobre FPSR para brucelose devido à administração de Levamisole lidando com rebanhos bovinos e alguns fatores ambientais e individuais.

A baixa incidência (1.41%) de animais com FPSR após aplicação de levamisole no diagnóstico para brucelose, testados segundo o PNCEBT, é um resultado positivo pelo pequeno número de perdas que pode ocasionar o seu aparecimento em um grande número de animais, e negativo ao causar perdas aos pequenos produtores.

Dentre os imunomoduladores, destacam-se os produtos de origem vegetal, microbiana, os fármacos de origem natural e sintética, além das proteínas derivadas da ativação do próprio sistema imune (MASIHI, 2000).

A imunomodulação pode alterar o funcionamento do sistema imune de um indivíduo (MAKARE *et al.*, 2001). Os imunomoduladores são capazes de simultaneamente estimular algumas células do sistema imune e suprimir outras. Por exemplo, alguns compostos podem estimular a produção de anticorpos IgG2 e simultaneamente inibir a produção de IgM, ou ainda estimular linfócitos T e inibir linfócitos B (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003)

Os imunomoduladores podem aumentar os mecanismos de defesa do hospedeiro (imunoestimulantes) ou diminuí-los (imunossupressores) (MASIHI, 2000). Os imunoestimulantes estimulam os mecanismos que envolvem tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida, através da ativação de células e mediadores, enquanto os imunossupressores agem seletivamente sobre os mecanismos envolvidos na imunidade adquirida (STITES & TERR, 1995).

O efeito primário do levamisole sobre o sistema imunitário é geralmente considerado como atuando na restauração da deficiência ou depressão da função das células envolvidas na resposta imune, normalmente estimulando a produção de linfocinas e aumentando a síntese protéica na atividade receptora da membrana para IgG e C3, a blastogênese e a fagocitose, por meio de células polimorfonucleares (PMN), essenciais para o mecanismo de defesa (AMERY,

1978, CUESTA, *et al* 2002). Também foi relatado o aumento na atividade de leucócitos em seres humanos (BRUNNER, 1980).

O efeito do Levamisole sobre as células do sistema imune, principalmente linfócitos T, monócitos e neutrófilos, parece ser mais evidente quando em pacientes em condições de imunodepressão tratados com o fármaco (ROITH, 1984).

O conceito de imunostimulante em imunodeprimidos parece ser a explicação para o aparecimento dos FPSR no diagnóstico da brucelose após o uso de Levamisole. A rotina de exames laboratoriais e diagnóstico animal para a maioria das doenças infecciosas não é largamente disponível, além de ter custo elevado para um grande número de animais. Por este motivo o levantamento do estado imune destes animais não é realizado em animais FPSR na rotina atual de diagnóstico para brucelose.

Em uma pecuária de pasto como a brasileira, a sazonalidade de produção das pastagens e a "falta de costume" de tratar o pasto como uma lavoura, limita a produtividade. O cio das vacas também se torna sazonal, pois a maioria delas cicla apenas quando as condições de pasto são ótimas. Faltam volumosos na seca, sejam eles capim seco ou outra reserva, como cana, capineira, silagem ou feno. Muitos procuram, sem sucesso, soluções milagrosas como gramíneas que produzam sem adubo, não sequem ou suportem geadas no inverno. São necessários 60 a 80 kg de pasto verde para suprir as necessidades diárias de uma vaca adulta. A produção de pasto encontra-se muito dependente das estações do ano e das condições climáticas (precipitação, luminosidade e temperatura). A produção é máxima na Primavera, não ocorre no Verão, apresenta um pico variável no Outono (dependente da pluviosidade) e não ocorre no Inverno onde a pastagem apresenta-se com boa qualidade, mas com crescimento reduzido, pelo que é deficiente em energia, sendo incapaz de responder às necessidades de ingestão das vacas, que se encontram depauperadas, depois do Verão e da lactação. (FRAÚSTO SILVA & LEMOS, 2005; CANCELA de ABREU, 2010).

A incidência de animais com FPSR na primavera foi de 4,27% e nas outras estações do ano foi de 0,18%. O risco relativo de encontrar animais FPSR na primavera foi 23,42 vezes mais provável do que em outras estações do ano. A fração etiológica do risco de 95,73% significa dizer que, 95,73% dos FPSR ocorreram pela exposição ao levamisole mais a variável modificadora do efeito primavera. A fração atribuível à população de 87,03% mostra o efeito da eliminação do fator de risco para FPSR, ou seja, mede o quanto a ocorrência de FPSR pode ser diminuída se não fosse realizada avaliação sorológica para brucelose na primavera, até uma semana após aplicação de levamisole.

A incidência de animais com FPSR com CC ruim foi de 10,34% e com CC boa foi de 1,06%. O risco relativo de encontrar animais FPSR com CC ruim foi 9,74 vezes mais provável do que em animais com CC boa. A fração etiológica de risco de 89,73% significa dizer que 89,73% dos FPSR ocorreram pela exposição ao levamisole mais a variável modificadora do efeito CC ruim. A fração atribuível à população de 24,47% mostra o efeito da eliminação do fator de risco para FPSR, ou seja, mede o quanto a ocorrência de FPSR pode ser diminuída se não fosse realizada avaliação sorológica para brucelose em animais com CC ruim, até uma semana após aplicação de levamisole.

Segundo Brunner e Muscoplat (1980), o levamisole é claramente um agente imunopotenciador. No entanto, a eficácia de levamisole em bovinos e suínos é altamente dependente da condição do animal (com mais eficácia nos imunocomprometidos ou nos hospedeiros estressados), do que da dose utilizada e do tempo de administração. Isto também concorda quando da comparação da concentração do levamisole, a incidência de FPSR no grupo GLEV2 (18,8%) foi de 1,89% enquanto que no GLEV1 (7,5%) foi de 0,66% não mostrando diferença estatística significativa, ou seja, a concentração diferente do imunomodulador não influenciou no maior ou menor aparecimento de FPSR.

Também em outros experimentos, levamisole administrado (6 mg/kg) a terneiros não estressados no momento da vacinação provocou diminuição de anticorpos e respostas imunes celulares a herpes vírus bovino (BABIUK e MISRA, 1981). No entanto, em um estudo semelhante, usando a mesma dose de levamisole em terneiros que foram transportados antes do tratamento, observou-se um aumento na resposta de anticorpos (BABIUK e MISRA, 1982).

CONCLUSÃO

A utilização do levamisole como imunoestimulante e anti-helmíntico é amplamente utilizada com sucesso em medicina animal, e permanece recomendada no presente estudo. Entretanto, para a utilização segura do medicamento evitando a perda de animais FPSR, frente ao diagnóstico da brucelose, recomenda-se um período de carência de no mínimo 15 dias entre a aplicação do medicamento e a realização do diagnóstico para brucelose bovina.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo foi realizado no Centro de Controle de Zoonoses da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), RS, Brasil, e no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da UFPEL cujas equipes gostaríamos de agradecer, assim como a todos que de alguma forma contribuíram na realização dos trabalhos.

BIBLIOGRAFIA

Amery, WK. (1978) **The Mechanism of Action of Levamisole: Immune Restoration through Enhanced Cell Maturation.** *Jour. of The Ret. Soc.*: New York, **24**: 187-193.

Babiuk, LA and Misra, V. (1981). **Levamisole and bovine immunity: in vitro and in vivo effects on immune responses to herpes virus immunization.** *Can. Jour. of Microb.* **27**: 1312–1319.

Babiuk, LA and Misra, V. (1982). **Effect of levamisole in immune responses to bovine herpes virus-1.** *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 1349-1354.

Brasil (2001). Instrução Normativa /SDA no. 2 de 10.1.2001. Diário Oficial da União, 4 jun. 2001. Seção 1, p.26-31. Secretaria de Defesa Animal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. <http://www.agricultura.gov.br/das/dda/programa.html>.

Brasil (2006), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Manual Técnico, **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, 2006, 190p.

Brunner, CJ, and Muscoplat, C. (1980). **Immunomodulatory effects of levamisole.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **176**:1159.

Brunner, CJ. (1980) **Immunomodulatory Effects of Levamisole.** *J. A. V. M. A.*, **176**: 1159-1162.

Cancela de Abreu, M. (2010). **Suplementação em bovinos e ovinos em extensivo.** *II Jornadas Hospital Veterinário Muralha de Évora, Évora, Portugal, 05 Março 2010.* Acessado em Mar. 30, 2010, Disponível em: http://www.hvetmuralha.pt/uploads/cms/20100316175131_Suplementacao_de_bovinos_e_ovinos_em_extensivo.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2013

Castrucci, G, Ferrari, M, Osburn, BI, Frigeri, F, Barreca, F, Tagliati, S, Cuteri, V. (1994) **The use of a non-specific defence mechanism inducer in calves exposed to bovine herpesvirus-1 infection: preliminary trials.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, **18**: 85-91.

Castrucci, G, Osburn, BI, Frigeri, F, Ferrari, M, Salvatori, D, Lodico, M, Barreca, F. (2000) **The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, **23**: 91-97.

Chukwu, CC. (1985). **Serological Response of Cattle Following Brucella abortus Strain 19 Vaccination and Simultaneous Administration of Levamisole.** *Int. Jour. Zoon.* **12**: 196- 202.

Cuesta, A; Esteban, MA, Meseguer, J. (2002) **Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **89**: 169-174.

Curate, F.; (2003/2004) **A Brucelose em paleopatologia: Um estudo de caso proveniente da necrópole Cristã de Cacela Velha.** *Antropologia Portuguesa*. **20-21**: 209-235.

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, et al. (1994) Epi-Info Version 6. A statistical program for epidemiology on microcomputer. Atlanta, GA, USA: Centre for Disease Control and Prevention.

Drews, J. (1984) **Immunostimulation: Clinical and experimental perspectives.** *Klin Wochenschr.*, **62**: 254-264.

Fraústo-Silva, M., LEMOS, JPC. (2005) **Produção Animal I: Produção de bovinos de carne.** Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. (Rinotraqueite bovina)

Gerbier, G, Garin-Bastuji, B, Pouillot, R, Very, P, Cau, C, Berr, VN, Dufour, B. and Moutou, F. (1997). **False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial.** *Vet. Res.* **28**:375–383.

Kayaalp, O.(1998) *Tibbi Farmakology*. 8th ed., Hacettepe TAS Kitabevi, Ankara (in Turkish), pp. 417.

Makare, N; Bodhankar, S; Rangari, V. (2001) **Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice.** *Journal of Ethnopharmacology*, **78**: 133-137.

Masihi, KN. (2000) **Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections.** *Intern, Jour. of Antimicrob. Agents*, **14**: 181-191.

Molife, R; Hancock, BW. (2002) **Adjuvant therapy of malignant melanoma,** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.**44**: 81-102.

Nielsen, K; (1990) **The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* O:9 or O:16 to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassays.** *Vet. Immunol. Immunopathol.* **24**: 373-382.

Nunes-Pinheiro, DCS, Leite, AKR de M, Farias, VM, Braga, LT & Lopes, CAP. (2003) **Immunomodulatory activity of the medicinal plants: perspectives for veterinary medicine** *Ciência Animal*, **13**:23-32.

OIE (2013) World Organisation for Animal Health. Brucellosis: recent developments towards One Health (G.E. Plumb, S.C. Olsen & G. Pappas, eds). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **32**: 271–278.

Ramon, G. (1925) **Sur L'Annentation a Normale de L'Antitoxine Chez Lez Checoux Producteurs de Serum Antidiphthérique.** *Bull. Soc. Cent. Med. Vet.* **101**: 227.

Renoux, G. (1978) **Modulation of Immunity by Levamisole**. *Pharmac. Therapy*, **2**: 397 – 423.

Rodrigues, OG, Sousa, MRQ, Duarte, MHS, de Castro, RS, Medeiros, PL. (2005) **Avaliação da Influência de Levamisole sobre Padrões de Proteínas e Leucograma em Caprinos (*Capra Hircus*) Nativos da Região do Semi-Árido Nordestino**. *Agrop. Cient. no Semi-Árido*. **01**: 50-58.

Roith, JA (1984). **Effect of Levamisole on Lymphocyte Blastogenesis and Neutrophil Function in Dexametasonone - Treated Cattle**. *Mic. and Prev. Med. Am. Jour. Vet. Res.* **45**: 1781- 1784.

Sandoval LA. (1978) **Ação Imunoestimulante do Levamisole na Imunização de Cobaias Vacinadas Contra Brucelose**. *Arquivos Instituto Biológico.*, 45b. **4**: 313-318.

Stites, DP, Terr, AI (1995). *Basic and Clinical Immunology*, Appleton & Lange, 7nd. Edition, New York, 870p.

Thornes, RD (1977) **Treatment of Brucellosis in Humans**. *The Vet. Rec.* **101**: p. 7.

TIZARD, IR. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 6ª Edição. São Paulo. Roca, 2002, 265p.

Vanselow, BA. **The Application of Adjuvants to Veterinary**, (1987). *Med. Vet. Bull. England*, **57**, 11: 881-896.

Waghorn, TS; Leathwick, DM, Chen, LY, Skipp, RA, (2003). **Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastrointestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats**. *Veterinary Parasitology*, **118**: 227-234.

Xavier, MN, Costa, EA; Paixão, TA, Santos, RL. (2009) **The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis**. *Ciencia Rural*, **39**: 2252-2260.

Zoetis Brasil unidade de negócios de **Saúde Animal** da **Pfizer** Disponível em <<http://www.zoetis.com.br/Produtos-e-Servicos/Bovinos/>> Acesso em 12 set. 2013.

3. Artigos

3.2 Artigo de Revisão

Da *Brucella melitensis* à *Brucella inopinata*

Recuero¹, ALC, Brod^{2,3}, CS, Meireles², MCA.

¹ Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, Prédio N° 42, Pelotas, RS, Brasil.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário do Capão do Leão, Prédio N° 1, Pelotas, RS, Brasil

³ Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário do Capão do Leão, Prédio N° 42, Pelotas, RS, Brasil.

ALCR: alcrecuero@gmail.com

CSB: claudiomARBrod@yahoo.com.br

MCAM: meireles@ufpel.tche.br

RESUMO

Brucelose tem sido uma doença re-emergente desde a época da *Brucella melitensis* de David Bruce (1887) na ilha de Malta, até a *Brucella inopinata* de Scholz *et al.* (2010) isolada a partir de uma infecção endógena de um implante da mama numa mulher de 71 anos de idade, sendo que o ciclo de transmissão e o reservatório animal ainda são desconhecidos. O gênero *Brucella* é um membro da família *Brucellaceae* incluindo até agora, dez espécies que são cocobacilos intracelulares facultativos, gram-negativos, aeróbicos, não esporulados e sem motilidade. Nesta revisão são abordados os aspectos históricos, de sua importância econômica e social, etiológicos, imunitários, de resistência e sobrevivência, epidemiológicos, sinais clínicos, patogenia, diagnóstico tratamento, vacinação, prevenção e controle, bem como do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Do aspecto zoonótico e do potencial de bioterrorismo em que a *Brucella* spp é classificada pelo CDC como agente da categoria "B". As *Brucella* spp são consideradas como os mais comuns agentes bacterianos de infecção adquirida em laboratório. A Brucelose tem uma distribuição mundial tanto no homem como nos animais, só não ocorrendo nos países onde ela foi erradicada.

Palavras Chave: *Brucella*. Etiologia. Epidemiologia. Controle. Revisão

SUMMARY

Brucellosis has been a re-emerging disease since the time of *Brucella melitensis* David Bruce (1887) on the island of Malta, to the *Brucella inopinata* Scholz et al. (2010) isolated from an endogenous infection of a breast implant in a woman of 71 years old, with the transmission cycle, and animal reservoir still unknown. The *Brucella* genus is a member of the family including *Brucellaceae* far, ten species that are facultative intracellular gram-negative coccobacilli, aerobic, non-spore-forming and non-motile. In this review the historical aspects of their economic and social importance, etiology, immune, resistance and survival, epidemiology, clinical signs, pathogenesis, diagnosis, treatment, vaccination, prevention and control are presented, as well as the National Programme for Control and Eradication brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT). The zoonotic aspect and the potential for bioterrorism in the *Brucella* are classified by the CDC as an agent of category "B". *Brucella* are considered the most common agents of infection acquired in the laboratory. Brucellosis has a worldwide distribution in both men as in animals, occurring not only in countries where it has been eradicated

Key words: *Brucella*. Etiology. Epidemiology. Control. Review.

HISTÓRICO

O histórico da Brucelose data de 1600 aC, sendo qualificada como a possível quinta praga, relatada na história do Antigo Egito, suspeita de dizimar o rebanho bovino existente na época na região. Análises de medula óssea de múmias egípcias, revelam comprometimentos como osteoartrites provavelmente derivados de Brucelose datados de 750 aC (PAPAS et al, 2007).

Na Grécia Antiga entre 460 aC à 377 aC, Hipócrates, já distinguia outros tipos de febres, da “Febre Ondulante.” Esta enfermidade estava descrita em seu “Corpus Médico”, como doença de remissão e recorrência periódica, que se apresentava como uma febre irregular, prolongada, com suores profusos. A sazonalidade principal dos sintomas típicos era no outono e verão, e os enfermos não evoluíam na gravidade da doença, porém, apresentavam recaídas características (NARCISO, 1991; CURATE, 2004).

A erupção do vulcão Vesúvio na Itália, na cidade de Herculano, no ano 79 da era cristã, foi uma catástrofe que soterrou os habitantes. Recentemente, estudos dos esqueletos encontrados no local, revelaram lesões ósseas compatíveis com aquelas causadas pela Brucelose e os alimentos como queijos de leite de cabras carbonizados, que revelaram a presença de cocobacilos compatíveis com *Brucella* spp. (CAPASSO, 2002).

O nome Brucelose originou-se do médico David Bruce, que foi o primeiro a visualizar microscopicamente a bactéria *Micrococcus melitensis* em 1886, dando esse nome derivado de Melita (mel), o nome romano para a Ilha de Malta. Um ano depois, chefiando uma comissão médica na ilha, David Bruce conseguiu isolar *Brucella melitensis* do baço de militares mortos pela doença. Dez anos após, o médico veterinário, Bernard Bang, de origem holandesa, conseguiu isolar a *Brucella abortus* de um feto bovino abortado (GOMES, 2006; NICOLETTI, 2002).

A pesquisadora Alice Evans foi quem estabeleceu em 1918, a analogia entre a bactéria que infectava os caprinos, com a que infectava bovinos, abrindo uma

nova era de estudos sobre a Brucelose. Evans identificou pela primeira vez a bactéria em humanos nos EUA. Foram bem importantes ainda os estudos de Evans, que mostraram formas inusitadas de ocorrência da Brucelose. Também orientou a comunidade científica, para que a doença passasse a chamar-se Brucelose, em homenagem a David Bruce. (SRIRANGANATHAN *et al* 2009).

O gênero *Brucella* (Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rhizobiales, Família Brucellaceae) foi criado por Meyer e Shaw em 1920, com *B. melitensis* infectando os seres humanos e caprinos, e *B. abortus* infectando bovinos (MEYER & SHAW, 1920). Em seus estudos com 21 cepas de *B. melitensis* e 32 de *B. abortus* Meyer e Shaw chegaram à seguinte conclusão: "O organismo causador da febre ondulante do homem e da febre de Malta das cabras não pode ser distinguido morfológicamente ou bioquimicamente do organismo responsável pelo aborto infeccioso em animais domésticos".

As outras espécies de *Brucella* encontradas cronologicamente foram: *B. suis*, isolada de suínos nos Estados Unidos (TRAUM, 1914), *B. ovis*, isolada de ovinos na Nova Zelândia (BUDDLE 1956); *B. neotomae* isolada de ratos do deserto nos Estados Unidos (STOENNER & LACKMAN 1957), e *B. canis* isolada de cães da raça Beagle nos Estados Unidos (CARMICHAEL & BRUNER 1968). Todas elas sendo adicionadas ao gênero como novas espécies, juntamente com as duas primeiras, que foram exclusivamente classificadas e caracterizadas com base nas suas preferências fenotípicas e de hospedeiro.

A Brucelose foi descrita pela primeira vez na América do Sul em 1913 no Rio Grande do Sul, Brasil, pelo Dr. Manuel Gonçalves Carneiro, professor de Microbiologia e Pediatria da Faculdade de Porto Alegre que realizou diagnóstico clínico e bacteriológico do primeiro caso de febre ondulante causada pela *Brucella melitensis*. A infecção foi adquirida em Cidreira, praia balneária do Rio Grande do Sul, no município de Osório, onde havia um rebanho de cabras (GOMES, 2006). Um ano depois a Brucelose bovina foi diagnosticada clinicamente em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, pelo primeiro brasileiro formado em medicina veterinária, Dr. Danton Jacques de Seixas (BOLETIM..., 1988), que por curiosidade, nasceu no Município de Santa Maria, RS, Brasil, em 30 de novembro de 1888 (CRMV-RS, 2003), ou seja, no mesmo ano em que David Bruce descobriu a *Brucella melitensis*.

O primeiro estudo com base em resultados de pesquisas epidemiológicas e exames microscópicos de culturas obtidas de fetos abortados foi feito por Tinécio Icíbaci em 1922, que descreveu um foco de brucelose bovina em São Carlos – SP (BRASIL, 1988, PAULIN & FERREIRA NETO, 2002).

Mello e Neiva, em 1928, isolaram *B. abortus* do sangue de uma vaca que havia abortado. Em 1931, Sílvio Torres verificou a existência de oito animais soropositivos para brucelose e 19 suspeitos em um lote de 51 bovinos importados. Como conseqüência, em 1933 César Pinto propôs a implementação de protocolo de testes em animais importados como forma de impedir a disseminação da doença no país (BOLETIM..., 1988).

O Rio Grande do Sul foi pioneiro no que se refere ao combate à brucelose bovina quando em 1936, Desidério Finamor detectou pela primeira vez bovinos soropositivos para brucelose e propôs um plano para seu controle (MARVULHO et al., 2009). Diversos estudos sorológicos para diagnóstico da brucelose foram realizados no Estado (ALMEIDA *et al.*, 1988, BOLETIM..., 1998-2000, PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

No Rio Grande do Sul, em 1941, foram promulgados os decretos-leis estaduais números 276 e 276a, que regulamentavam a entrada de reprodutores importados e a admissão de animais em exposições e feiras com resultados negativos para brucelose. Em 1948, o Centro de Pesquisas Desidério Finamor foi encarregado da produção da vacina B19, que era aplicada nos animais pelas Inspetorias Veterinárias dos municípios (RIO GRANDE do SUL, 1961).

Thiago de Mello, em 1950, relatou a disseminação da brucelose bovina por todo o país apontando para uma prevalência de 10 a 20%, sendo que os índices mais altos estavam nas regiões leiteiras do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (GARCIA-CARRÍLLO, 1987).

No Rio Grande do Sul, em 1953, criou-se o Serviço de Erradicação da Brucelose Bovina e foram organizados planos de controle baseados no programa americano. O resultado não foi satisfatório devido à produção insuficiente de vacina pelo Estado. Em 1961, outro programa foi iniciado, baseado na vacinação de bezerras entre quatro e oito meses de idade, na realização de sorodiagnóstico em todos os plantéis e na marcação dos vacinados e dos reagentes. Em 1964, a Lei

Estadual número 4890 instituiu a obrigatoriedade do combate à brucelose animal. O Decreto Lei nº17217, publicado em 1965, aprovou o regulamento do serviço de combate à brucelose animal e tornou obrigatória a vacinação das bezerras entre quatro e oito meses de idade (MARVULO *et al*, 2009).

A história relata que a transmissão da enfermidade ocorria em função da utilização de leite cru na alimentação dos homens, e estas práticas eram comuns muitos séculos antes de Cristo. Apontada como uma doença comprovadamente tão antiga perpetuou-se entre os homens e animais até a atualidade (PAPAS *et al*, 2006). A doença está presente ainda hoje, em detrimento dos avanços culturais e científicos, da comunicação global, e do advento da Pasteurização, que foi um grande salto na qualidade alimentar, para os homens principalmente. Atualmente, a OMS (Organização Mundial da Saúde) lista a Brucelose como doença de segurança nível 3, sendo usada até para bioterrorismo (BOSCHIROLLI, 2001; YAGUPSKI & BARONT, 2005).

Themistocles Zammit, médico maltes, em 1904, estudando as cabras de Malta através do Teste de aglutinação de Zammit em soro sanguíneo e culturas de leite, verificou que quase metade do rebanho era positivo para a Febre de Malta e que cerca de 10% das cabras secretavam as bactérias da doença no leite (WYATT, 2000, 2005, 2009, 2011).

Após a descoberta de Zammit, em 1906, o uso de leite de cabra para os serviços da Armada britânica foi proibido, sendo recomendado uso de leite condensado ou leite em pó esterilizado fazendo com que o número de casos fosse reduzido drasticamente. Entre 1900 e 1906 houve um total de 3.631 casos da doença, passando em 1907 para apenas 21. Em 1909, a grande ala hospitalar do exército estava vazia e ela foi usada para uma enorme recepção (WYATT, 2013).

A *Brucella* spp. foi reconhecida precocemente como agente de bioterrorismo internacional, e tem sido tradicionalmente considerada como arma biológica. Seu nome consta como patógeno, na lista de biodefesa de centros de referência internacionais, como no Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, e do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID). Na segunda guerra mundial, antes e durante seu curso, o Japão experimentou em humanos, este agente, na unidade 731 de Manchúria, assim como na antiga União

Soviética a bactéria foi utilizada, no seu extenso programa de armas biológicas pesquisados durante a guerra fria (PAPAS *et al*, 2006).

IMPORTÂNCIA

A importância da Brucelose em saúde pública é baseada no fato desta doença apresentar cerca de 500 mil casos novos humanos a cada ano (KATO, 2007; CUTLER, 2006), nos efeitos morais, econômicos, e clínicos que advêm da infecção, que causa graves danos nos indivíduos enfermos. As significantes perdas reprodutivas nos animais representam o grande impacto econômico causado pela doença em saúde animal (SRIRANGANATHAN *et al* 2009, XAVIER, *et al* 2009).

Os prejuízos econômicos são observados na redução das taxas de fertilidade, natalidade e perdas na produção de leite e carne. Tratando-se de Brucelose, por apresentar caráter zoonótico, a identificação e a eliminação das fontes de infecção são de primordial importância, pois desta forma o bloqueio da transmissão aos homens e animais susceptíveis pode ser realizado de forma efetiva (NIELSEN, 1990, JÚNIOR, *et al* 2012).

Segundo Santos *et al.* (2013), cada vaca infectada representa uma perda estimada de R\$ 420,12 ou R\$ 226,47 no caso de gado leiteiro ou de corte, acima de 24 meses de idade respectivamente. Total de perdas estimadas no Brasil foram em cerca de R\$ 892 milhões (correspondente a 448 milhões dólares americanos), o que corresponde a 0,3201% do PIB de 2011 do Brasil referente à produção animal ou 0,0215% do PIB Nacional de 2011.

A análise de Santos *et al.* (2013) indica que um aumento de um por cento na prevalência da Brucelose Bovina brasileira, resulta em uma perda adicional de R\$ 0,73 (setenta e três centavos de reais ou 0,37 centavos de dólares americanos) por cabeça de bovino no Brasil. Considerando a atual população bovina estimada, resultaria em uma perda adicional de R\$ 154.938.095,65 para cada aumento de 1% na prevalência, e ganho econômico obviamente proporcional associado a uma diminuição da prevalência.

A Brucelose tem forte impacto na saúde humana, pois causa emagrecimento progressivo, prostração física com incapacidade total ou parcial para o trabalho;

depressão psicológica, problemas na reprodução, que podem levar à incapacidade sexual. O Ministério da saúde inclui a Brucelose (Brucelose A23), através da Portaria nº 1339/1999, como doença predominantemente relacionada ao trabalho (LAWINSK, 2010).

A Brucelose é um sério problema em diversas partes do mundo, na atualidade *Brucella* spp são cogitadas para o uso em ataques de bioterrorismo (CORBEL, 2006; LAWINSK, 2010). Considerada como doença de categoria B na listagem de pesquisa de biodefesa do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), é conhecida por seu significativo potencial como arma biológica (SELEEM, *et al.*, 2010).

Em estudos hipotéticos de cenário de guerra biológica, no caso de 100 mil pessoas expostas, a aspersão de *Brucella melitensis* em forma de aerossóis, em circunstâncias ideais de dispersão, causaria 82.500 casos da doença e 413 mortes, com um impacto econômico de U\$ 477.7 milhões de dólares (KAUFMANN *et al*, 1997). Entretanto as pesquisas da contaminação alimentar da bactéria como arma biológica, somente teria efeito se utilizada após a pasteurização dos alimentos (PAPPAS, *et al*, 2006). Estes exemplos refletem o despreparo da humanidade para armas biológicas e sua importância mundial.

Falenski *et al.* (2011) mostraram que *Brucella* spp. sobrevive por 87 dias em leite UHT, por 60 dias na água e menos de uma semana no iogurte. Este estudo é um bom exemplo para a contaminação intencional de alimentos com *Brucella* spp. (DOGANAY, and DOGANAY, 2013)

ETIOLOGIA

A Brucelose é uma doença infecciosa que se caracteriza por ser uma zoonose, e uma antropozoonose (PAPAS *et al*, 2006; CAPASSO, 2002). Do ponto de vista epidemiológico, as zoonoses são doenças que se transmitem mutuamente entre homens e animais; e as antropozoonoses são doenças que se propagam dos animais em direção aos homens. A Brucelose se caracteriza, pelo fato de que, geralmente se transmite dos animais para os humanos acidentalmente (NICOLETTI, 1990, ALMEIDA, 2006).

A listagem de nomes dados à Brucelose em diversas localidades distribuídas em todo o mundo é bem característica. Febre de Malta, Febre Ondulante, Febre do Mediterrâneo são denominações dirigidas aos homens, já os nomes de: Aborto Infeccioso, Aborto Contagioso, Aborto Epizootico são usados para animais, e Doença de Bang e Brucelose principalmente para bovinos. Nos estudos realizados entre 2000 e 2010 é quase unânime a nomenclatura Brucelose para esta enfermidade (NIELSEN, 2001; GALL, 2002; PAPPAS, 2006; EL-RAZIK, 2007; CHACHRA, 2009).

As bactérias do gênero *Brucella* spp são bastonetes, cocos ou cocobacilos gram negativos, aeróbios, imóveis, que em sua maioria requer suprimento de CO₂ para seu cultivo primário. As características de suas colônias são transparentes, convexas com bordos inteiros, elevadas, lisas e com superfície brilhante, com incidência de luz artificial apresentam cor de Mel. A temperatura ótima para o micro organismo é de 37°C, porém o crescimento pode ser feito de 20°C até 40°C, e o pH ideal varia de 6,6 à 7,4 (NIELSEN *et al*, 2004, GOMES, 2006).

Verger *et al.* (1985), com a utilização da moderna tecnologia de hibridização DNA-DNA, confirmaram a proximidade genética entre as várias espécies. Uma vez que todas as espécies testadas e biovars tinham uma proporção de ligação ao DNA (relação genética) de mais de 80%. Os autores chegaram à conclusão de que uma única espécie, *B. melitensis*, deveria ser reconhecida no gênero *Brucella*. Dois anos depois, De Ley *et al.* (1987), chegaram à mesma conclusão.

Antes do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, a diferenciação das várias espécies de *Brucella* e seus biovars era baseada apenas em informações fenotípicas, ou seja, exigência de CO₂, produção de H₂S, sensibilidade a corantes, perfis metabólicos, lise por Bacteriófagos específicos de *Brucella* e aglutinação com anti-soros monoespecíficos (SCHOLZ *et al.*, 2013). Outro critério importante para a diferenciação das várias espécies de *Brucella* foi a preferência pelo hospedeiro natural, razão pela qual os nomes das espécies foram dados de acordo com o seu hospedeiro preferido. Hoje é conhecido que todas as espécies de *Brucella* são altamente relacionadas no nível genético, exibindo 16S rRNA idênticos (GEE *et al.*, 2004) e sequências do gene *recA* (SCHOLZ *et al.*, 2008b), bem como genomas altamente similares em termos de identidade de seqüência e sintonia genética (DEL VECCHIO *et al.*, 2002; PAULSEN *et al.*, 2002; HALLING *et al.*, 2005)

Brucella spp é uma bactéria intracelular facultativa, e suas espécies poderiam ser identificadas neste momento por: Velhas espécies (espécies clássicas), Novas Espécies e Futuras Espécies.

Velhas Espécies (espécies clássicas)

1. *Brucella melitensis* (BRUCE, 1887) - encontrada principalmente infectando cabras, ovelhas e bovinos e possui 3 biovars correspondentes (CUTLER, 2006) sendo a espécie mais patogênica para o homem, porém não sendo encontrada no Brasil (GOMES, 2006; GAMAZO, 2006). Sua infectividade para o homem é tão alta que apenas alguns organismos (10 a 100) são suficientes para causar uma infecção crônica debilitante (FUGLER *et al.*, 2007). Gomes (2006) comenta o primeiro caso ocorrido no Brasil no ano de 1913 como sendo causado por *B. melitensis*. Este caso levanta a suspeita da provável existência desta espécie no Brasil, deixando em aberto a possibilidade de estudos prospectivos.

2. *Brucella abortus* – (BANG, 1897) possui 7 biovars e o reservatório mais comum é o bovino, mas também pode infectar cães, cavalos, cabras ovinos, camelos, veados, búfalos e o homem (CUTLER, 2006; KUDI *et al.*, 1997). Estudos realizados na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) revelaram três casos de Brucelose humana, em médicos veterinários acidentalmente vacinados com a B19, no Município de Rio Grande, RS, Brasil, enfatizando o caráter ocupacional da doença, e sugerindo que o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), são

essenciais no manuseio da vacina (TRINDADE, *et al.*, 2008). Suínos podem se infectar por *B. abortus*, e a convivência com outras espécies animais propicia a transmissão da doença (APARÍCIO, 2013).

3. *Brucella suis* (TRAUM, 1914) – Apresenta cinco biovars e o reservatório preferencial é o suíno (CUTLER, 2006). Os homens podem se infectar por esta espécie (KUPLULU, 2004), além de roedores silvestres, lebres, e renas (HER, 2010). No Brasil, somente o biovar 1 foi isolado, e há poucos relatos de *B. suis* no país, com uma soroprevalência de 0,34% (BRASIL, 2000).

4. *Brucella ovis* (Budle, 1956) - *B. ovis* é uma espécie rugosa estável, não zoonótica que produz uma enfermidade clínica ou subclínica crônica, caracterizada por alterações testiculares e subsequente baixa fertilidade em carneiros e ocasionalmente aborto em ovelhas (FICAPAL *et al.*, 1998). Embora alguns pesquisadores sugiram o contágio do homem, não há relatos do isolamento da *B. ovis* no homem. Tem sido relatada na Austrália, Nova Zelândia, África do Sul e muitos países da Europa. Ela ocorre na maioria das regiões de criação de ovelhas no mundo (BURGUESS, 1982). No Brasil, segundo Magalhães Neto & Gil-Turnes (1996), inquérito sorológico no estado do Rio Grande do Sul demonstrou uma soroprevalência média em rebanhos de ovelhas positivas de 13,4% (variando 6,9-50%).

5. *Brucella canis* (CARMICHAEL & BRUNER, 1968) – Infecta cães domésticos, carnívoros silvestres e raramente outros animais domésticos. A infecção de cães com *B. canis* é generalizada no Brasil, com prevalência variando entre 0,84 - 58,3 % e está concentrada principalmente nas regiões Sudeste e Sul do país (AZEVEDO *et al.*, 2003; KEID *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2005)

Brucella ovis e *B. canis* apresentam antígenos na superfície de seu lipopolissacarídeo (LPS), os quais podem ser usados para o diagnóstico tanto de brucelose canina quanto de ovina. O teste de Agar Gel Imunodifusão (AGID) utilizando antígenos LPS de *B. ovis* tem sido extensivamente usado no diagnóstico de brucelose canina, bem como o (SAT) teste de aglutinação em lâmina (CARMICHEL, & SHIN, 1996; MEGID, *et al.*, 1999; MELO, *et al.*, 1997; MÓLNAR, *et al.*, 2001; MORAES *et al.*, 2002). Entretanto, estes testes frequentemente podem apresentar reações sorológicas falso-positivas (FPSR) devido a antígenos de superfície comuns

a outras bactérias tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. e *Bordetella bronchiseptica* (CARMICHEL, & SHIN, 1996; HUBBERT, BECH-NIELSEN, BARTA, 1980; MATEU-de-ANTONIO, MARTÍN, CASAL, 1994; NIELSEN, & DUNCAN, 1990). Tanto AGID quanto SAT são testes de baixa sensibilidade, podendo falhar na detecção tanto de infecções precoces como de infecções crônicas (CARMICHEL, 1976; NIELSEN, & DUNCAN, 1990). Como consequência da inacurácia dos testes sorológicos, métodos bacteriológicos (cultura) devem ser utilizados para confirmar o diagnóstico (KEID *et al.* 2004).

6. *Brucella neotomae* (STOENNER & LACKMAN, 1957) – Conhecida por infectar apenas os ratos do deserto, sob condições naturais, nos EUA, e não há outros casos em adição ao isolamento original.

Novas Espécies

Os Cetáceos, do latim *cetus* (grande animal marinho) e do grego *ketos* (monstro marinho), são animais com formas e tamanhos variados, desde os pequenos golfinhos, que mal ultrapassam um metro de comprimento, até a baleia azul, que mede cerca de 25 metros de comprimento e que é o maior animal vivo da Terra. Além de baleias e golfinhos, outros animais pertencem a este grupo, como a orca, o boto, o narval e o cachalote. Os Cetáceos distribuem-se por todos os oceanos e pela maioria dos grandes rios de todo o mundo, desde as águas quentes do equador até as águas frias dos pólos, abrangendo atualmente 92 espécies (PERRIN, 2009)

Durante muitos anos pensou-se que as baleias e os golfinhos fossem peixes, com a particularidade de esguicharem água. À primeira vista, os golfinhos e os botos podem parecer peixes, em particular tubarões, pela forma do corpo. Se olharmos com atenção podemos verificar que apesar de viverem na água, possuem barbatanas dorsais, laterais e caudais, há algumas diferenças. A cauda de um cetáceo é horizontal e move-se de baixo para cima, enquanto que a cauda de um peixe é vertical e move-se lateralmente. Pelo fato de serem mamíferos, apresentam ainda diferenças fisiológicas, têm sangue quente, respiram ar e reproduzem-se mais cedo (Cetáceos, Fauna e Flora, 2013).

Os pinípedes (latim científico: *Pinnipedia*) constituem uma superfamília de mamíferos aquáticos, que inclui focas, leões marinhos e morsas, embora em

algumas classificações sejam super-famílias. A origem do nome Pinípede deriva do termo em latim *pina* e *podos* que significa pé em forma de pena, que se refere aos membros posteriores e anteriores dos animais que possuem extensas membranas interdigitais, que servem para a locomoção no ambiente aquático. Os pinípedes são animais que são adaptados para o ambiente aquático, sendo membros da Ordem Carnívora, dividindo-se em três famílias: *Otariidae* (lobos e leões marinhos), *Odobenidae* (morsas) e *Phocidae* (focas). Estas três famílias mencionadas são pertencentes à sub-ordem Pinnipedia (PINEDO. *et al.* 1992).

Desde a descoberta de uma distinta espécie de *Brucella* encontrada em fetos de golfinhos abortados (EWALT *et al.* 1994), um crescente número de isolados de diferentes cetáceos tem sido relatado. Estes isolados pertencem a diferentes conglomerados de bactérias com afinidade por golfinhos, focas e baleias. Excepcionalmente alguns destes isolados de cetáceos pertencem a um diferente grupo de *Brucella* spp., que preferencialmente infecta focas e baleias (MAQUART *et al.*, 2009a). Seguindo a convenção para a nomenclatura de *Brucella*, que tradicionalmente nomeia a espécie depois de seu hospedeiro preferencial, os isolados de cetáceos foram primeiramente designados como *Brucella maris* (JAHANS *et al.*, 1997), depois como *Brucella cetacea* (CLOECKAERT *et al.*, 2001) e finalmente corrigido para *Brucella ceti* (FOSTER *et al.*, 2007). Os isolados de *pinnípedes* eram diferentes dos de *B. ceti*, portanto foram nominados *Brucella pinnipedialis* (FOSTER *et al.*, 2007).

7. *Brucella ceti* (FOSTER *et al.*, 2007) – Em 1994, Ewalt e colaboradores, nos Estados Unidos, isolaram de um cetáceo (golfinho) capturado. Mais tarde, esses isolados foram incluídos no gênero *Brucella* com o nome de *B. ceti* (FOSTER *et al.* 2007).

Os cetáceos são os reservatórios preferenciais da *B. ceti*. Baleias, golfinhos e focas são importantes atrações turísticas em aquários e litorais (ORAMS, 1997; HOYT & IÑIGUEZ, 2008) e golfinhos são usados em terapias médicas (ANTONIOLI & REVELEY, 2005). Um fenômeno que faz com que as pessoas entrem em contato com estes atrativos animais é a chegada aos litorais de golfinhos focas e baleias desorientadas, iniciando a partir daí um problema para banhistas. Durante os últimos anos, estas ações e contatos entre cetáceos e humanos têm aumentado no mundo

(MALAKOFF, 2001; BRENSING, 2004; HERNÁNDEZ-MORA *et al.*, 2008), aumentando o risco de transmissão de *Brucellas* spp. patogênicas destes mamíferos marinhos para as pessoas e animais domésticos.

Embora cepas de *Brucella* spp. de animais terrestres não tenham sido encontradas em cetáceos, o oposto não é verdadeiro, e *B. ceti* já foi isolada de humanos, comprovando o potencial impacto zoonótico desta *Brucella* (McDONALD *et al.*, 2006; WHATMORE *et al.*, 2008).

Em fevereiro de 2002, um paciente do sexo masculino de 43 anos de idade, do Sul de Auckland na Ilha Norte da Nova Zelândia, apresentando com 2 semanas de sintomas, osteomielite espinhal, febre, calafrios e sensibilidade da coluna vertebral lombar. As amostras de sangue foram testadas em dois laboratórios médicos da Nova Zelândia (M e L) por um teste de triagem de aglutinação utilizando como antígeno *B. abortus* (Immunostics, Inc.; Remel), um teste de aglutinação (SAT), utilizando como antígeno *B. abortus* (Murex) com ou sem a adição de 2-mercaptoetanol, e um teste de Coombs anti-*Brucella* usando anti-globulina humana (CSL Epiclone). O paciente apresentou resultados positivos com todos os três testes sorológicos no prazo de 36 dias de início da doença, apresentando resultados negativos no SAT e com um título em declínio no teste de Coombs 153 dias a partir do início da doença. A aspiração da lesão ilíaca direita não resultou em isolamento do agente, mas 3 dias depois conseguiu-se hemocultivos positivos com um bacilo gram-negativo. O isolado foi identificado como estando estreitamente relacionado com a *Brucella* sp. oriunda de um golfinho dos Estados Unidos (*Tursiops truncatus*) e de focas comuns (*Phoca vitulina*). (McDONALD *et al.*, 2006).

O paciente havia trabalhado embarcado por 10 anos anteriores à doença. Não havia antecedentes de uma doença similar. O paciente não tinha nenhuma exposição a leite não pasteurizado ou queijo e não tinha nenhuma exposição ocupacional a carne ou subprodutos. O paciente tinha carneado dois porcos em dezembro de 2001, o que levou à crença de que o paciente adquiriu a infecção ao carnear os porcos. Pesquisas clínicas e sorológicas da população de suínos associados e produtores de suínos foram realizadas, não sendo confirmados outros casos. Após a caracterização molecular do organismo (02/611), o paciente foi entrevistado novamente para determinar uma possível fonte de mamífero marinho

como a fonte da *Brucella* sp. O doente não tinha sido exposto a mamíferos marinhos, entretanto havia sido exposto a isca de peixe cru, incluindo sardinhas (*Sardina* e *Sardinops* spp.), bonito (*Sarda* spp.), Lula (*Nototodarus* sp.), tainhas (*Mugilidae*) e regularmente capturava anchova (*Chrysophrys auratus*), truta (*Arripis trutta*), encharéu bicudo (*Pseudocaranx dentex*) e ruivos (*Chelidonichthys kumu*). O paciente havia consumido anchova crua, recentemente capturada, com suco de limão e creme de coco (McDONALD *et al.*, 2006).

8. *Brucella pinipedialis* (FOSTER *et al.*, 2007) – focas como reservatórios preferenciais. Em 1994, Ross e colaboradores, na Escócia, isolaram e identificaram de penípedes (focas) uma nova espécie do gênero *Brucella*. Em 2007, os novos isolados foram incluídos no gênero *Brucella* como o nome de *B. pinnipedialis* (FOSTER *et al.* 2007).

Um grande estudo incluindo 102 isolados de *B. ceti* e *B. pinnipedialis* sugeriu que há uma variação substancial nas características de biotipagem para essas cepas, com a exigência de CO₂ sendo especialmente útil, pois os isolados de focas necessitam de CO₂ para crescer, e os isolados de cetáceos não (DAWSON, *et al.* 2008). Estas características estão em linha com os resultados anteriores de *Brucella* de um grupo de mamíferos marinhos consistindo de isolados de *pinnípedes* (incluindo uma lontra), e um grupo de cetáceos, com base em sua dependência de CO₂ (FOSTER *et al.* 1996, JAHANS *et al.* 1997) e a capacidade de crescer em meio de Farrell no cultivo primário (FOSTER *et al.* 1996).

O padrão metabólico oxidativo em diferentes substratos apoiou esta subdivisão, com o grupo um formado por isolados de focas e lontras, e o grupo dois e três consistindo de isolados de cetáceos. Cepas do grupo um não oxidaram L-arabinose e D-galactose, em contraste com os outros dois grupos. (Jacques *et al.* 2007). Um sistema de biotipagem comercial (Taxa Profile™, Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Alemanha) testou a metabolização de vários substratos também facilmente diferenciados entre as cepas de foca comum e de boto com uma especificidade de 100% (Al DAHOUK *et al.* 2010).

9. *Brucella microti* (SCHOLZ *et al.* 2008a) – Duas bactérias cocóides Gram-negativas, não-móveis, não-formadoras de esporos, (estirpes CCM 4915T e CCM 4916), foram isoladas a partir de amostras clínicas de ratazanas comuns (*Microtus*

arvalis) selvagens, durante uma epizootia que ocorreu no distrito de Breclav na Morávia do Sul, República Checa em 2001. Em um estudo taxonômico polifásico, foi observado, com base nas semelhanças de seqüência de genes por 16S rRNA (RRS) e *recA*, ambos isolados foram alocados no gênero *Brucella*. Por ser claramente distinta de todas as espécies de *Brucella* conhecidas e seus biovars por meio das propriedades moleculares e fenotípicas, foram caracterizadas como pertencentes a uma nova espécie dentro do gênero *Brucella*, sendo proposto o nome de *Brucella sp microti. nov.* com o 4915T cepa CCM (5BCCN 07-01T5CAPM 6434T). (SCHOLZ *et al.* 2008a).

B. microti desenvolveu adaptações resistentes ao ácido, tais como a do sistema descarboxilase ácido glutâmico (GAD), que funciona para facilitar a ultrapassagem do baixo pH do trato gastrointestinal do seu hospedeiro (AUDIC *et al.*, 2009). *B. microti* também foi isolada de gânglios linfáticos mandibulares de raposas selvagens (*Vulpes vulpes*) na Áustria. (SCHOLZ *et al.*, 2009). Em 2007, *B. microti* foi isolada com sucesso a partir do solo no mesmo local que o primeiro isolamento das ratazanas comuns em 2000 (SCHOLZ *et al.* 2008c). Devido a que sete anos se passaram e as células vivas ainda foram isoladas com sucesso, esta espécie tem demonstrado a sua capacidade de sobrevivência a longo prazo no solo. A espécie também pode ser isolada a partir de amostras de solo após ter sido mantida em armazenamento a 4 °C durante 6 meses (SCHOLZ *et al.* 2008c). A capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo fora de um hospedeiro mamífero no solo poderia ser um reservatório primário potencial de infecção, o que poderia facilitar o ressurgimento da brucelose (AI DAHOUK *et al.*, 2012, SCHOLZ *et al.* 2008c).

10. *Brucella inopinata* (BO1) (SCHOLZ *et al.* 2010). Isolada a partir de um implante de mama contaminado, de uma mulher do Oregon (USA) com sinais clínicos de brucelose. Estudos de hibridização DNA-DNA para examinar o nível de relação genômica de BO1 com duas cepas de referência, *B. melitensis* e 16M e *B. suis* 1330. A relação observada foi de 78 a 80% a 60°C e 81 a 83% a 75°C. Estes valores de hibridização indicam que a BO1 é membro do gênero *Brucella* (DE, BK, *et al.*, 2008).

A partir da análise fenotípica e molecular tornou-se evidente que a cepa BO1^T era claramente diferente de todas as outras espécies de *Brucella*, e, portanto,

representava uma nova espécie dentro do gênero *Brucella*. Por causa do seu isolamento inesperado, o nome *Brucella inopinata* foi proposto para a cepa BO1^T (SCHOLZ *et al.* 2010).

Uma perereca de olhos grandes, 4 anos de idade (*Leptopelis vermiculatus*), foi apresentada com duas (4 mm de diâmetro) massas firmes e dolorosas do lado direito de suas costas do tamanho de ervilha. As duas massas semelhantes a um abscesso foram abertas cirurgicamente, e um conteúdo pastoso branco-amarelo foi removido. Foi obtida em cultura pura, uma bactéria semelhante à *Brucella inopinata*, que foi resistente contra ampicilina e tilosina, mas sensível aos oito outros antibióticos testados. O organismo foi identificado pela reação em cadeia da polimerase e sequenciamento do ácido ribonucléico ribossomal 16S (de acordo com n. HE608873) e recA (de acordo com n. HE608874) genes após erro de identificação preliminar com *Ochrobactrum anthropi* quando se utiliza um sistema de identificação comercial. Para conhecimento dos autores, uma bactéria semelhante a *B. inopinata* não foi relatada previamente em anfíbios. O organismo é um potencial patógeno humano e pode representar um risco para pessoas que manipulam os anfíbios (FISCHER *et al.*, 2012).

Duas estirpes invulgares (*Brucella inopinata* BO1^T e *Brucella* BO2 semelhante à *inopinata*) foram isoladas a partir de pacientes humanos, e a sua similaridade com algumas brucelas atípicas isoladas a partir de espécies de roedores nativos australianos foram notadas. As análises filogenômicas das seqüências dos genomas de BO1^T e BO2 e das linhagens de roedores australianos 83-13 e NF2653 mostraram que eles formam dois grupos bem separados do seqüenciado de brucelas clássicas. A análise dos projetos genomas das quatro novas cepas demonstra claramente que elas são verdadeiras espécies de *Brucella* e mostra que o gênero é muito mais diversificado do que se imaginava, sugerindo que muitas cepas de *Brucella* não se encaixam nas definições fenotípicas elaboradas na década de 1970 com base nas cepas de brucelas clássicas (WATTAM, *et al.* 2012).

Recentemente, Bagüés *et al.* (2014) investigaram *B. inopinata* cepa BO1 (isolado humano) e *Brucella* spp. cepa 83-210 de roedores australianos. Foi usado como referência de infecção clássica a *B. suis* cepa 1330. O modelo de infecção de camundongos usado foi o de BALB/c, C57BL/6, e CD1 e também macrófagos

derivados de medula óssea de camundongos (BMDM). As Cepas BO1 e 83-210 apresentaram comportamento semelhante das estirpes de referência 1330, em todos os modelos de infecção de camundongos, ou seja, as curvas de crescimento similares em baço e fígado, assim como as taxas de replicação intracelular semelhantes em BMDM. No entanto, ao contrário da cepa 1330 tanto BO1 como 83-210 mostraram letalidade nos três modelos de camundongos. As novas cepas atípicas de *Brucella* deste estudo se comportam como patógenos intracelulares iguais aos da *Brucella* clássica e, além disso causaram a morte em modelos murinos de infecção, conforme publicado anteriormente para *B. microti*, outra espécie recentemente descrita no ambiente e em animais selvagens.

Futuras Espécies

Na Austrália, uma estirpe de *Brucella* incomum (BO2) foi isolada a partir da biópsia de pulmão de um paciente humano de 52 anos de idade, que teve pneumonia crônica destrutiva (TILLER *et al.*, 2010). As análises fenotípicas e moleculares da cepa colocaram a BO2 em estreita proximidade com *B. inopinata*. Assim, a estirpe BO2 provavelmente representa uma nova linhagem de *B. inopinata*. No entanto, extensas análises moleculares serão necessárias para confirmar esta proposição.

Brucella (BO2) foi isolada da biópsia pulmonar de um paciente de 52 anos de idade que viveu no Oregon, em duas ocasiões (1981 e 1985-1987), e sofreu uma "insuficiência hepática" inexplicável e, em seguida, pneumonia grave (com pleurisia) a partir da qual se recuperou com vários cursos de terapia antimicrobiana conforme relatado pelo paciente aos seus médicos na Austrália. Este paciente foi inicialmente diagnosticado por causa do erro de identificação da estirpe BO2 como infectado por *Ochrobactrum anthropi*, em um sistema API 20NE. É uma prática comum dos laboratórios clínicos para tentar a identificação rápida de organismos cocobacilos gram-negativos, como *Brucella* spp., a partir de cultura de sangue, utilizando sistemas automatizados. No entanto, *Brucella* spp. é muitas vezes erroneamente identificada devido às suas características fenotípicas semelhantes a organismos como *Ochrobactrum* spp intimamente relacionado. (BATCHELOR *et al.* 1992, ELSAGHIR and JAMES, 2003). Embora o paciente tenha sido tratado inicialmente tanto para *Ochrobactrum* como para infecções por *Brucella* spp., devido às dificuldades

de diagnóstico, ele se recuperou com um curso prolongado de terapia antimicrobiana orais combinadas (TILLER *et al.*, 2010).

Outra cepa com características típicas de *Brucella*, mas distinta das espécies atualmente descritas, foi recentemente isolada a partir de dois babuínos, apresentados como natimortos (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH *et al.*, 2009).

Duas fêmeas babuínas, uma selvagem capturada, multípara de 13 anos de idade, e outra de 8 anos de idade, nulípara, nascida em uma colônia, tiveram natimortos no segundo trimestre da gravidez. As culturas de ambos os úteros pós-parto revelaram isolados que foram caracterizados por análise bioquímica tradicional, PCR e sequenciamento multilocus. Os isolados morfológicamente assemelharam-se a *Brucella*, embora suas características fenotípicas não fossem consistentes com quaisquer espécies atualmente descritas. Os casos descritos são a primeira apresentação de uma infecção por *Brucella* naturalmente adquirida em primatas não-humanos associados com natimortos da mesma colônia onde a soropositividade para *Brucella* nos babuínos, foi descrita há 45 anos. O organismo parece representar uma espécie de *Brucella* ainda não descrita (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH *et al.*, 2009).

Finalmente, um relatório alarmante veio do Egito. Lá, *B. melitensis* foi isolada de *Clarias gariepinus*, um peixe de água doce do Nilo. Estes peixes foram supostamente infectados pela ingestão de resíduos de carne de animais infectados jogados no rio (ilegalmente) (EL-TRAS, *et al.*, 2010). Estes peixes poderiam servir como porta de re-entrada do patógeno para a cadeia alimentar humana.

A brucelose é endêmica entre os ruminantes na região do Delta do Nilo do Egito, onde os relatórios sugerem que a incidência de infecção humana está aumentando. Nesta região a prática de lançar resíduos animais em canais do Nilo é comum. Como resultado, a água pode estar contaminada com agentes patogênicos, potenciais zoonóticos, tais como *B. melitensis* que poderia infectar peixes. Com objetivo isolar e caracterizar *B. melitensis* de bagre do Nilo (peixe gato) foram coletadas amostras de soro de 120 bagres capturados de canais do Nilo e 120 bagres de fazendas viveiros para avaliar a presença de anticorpos contra *Brucella* spp. usando o teste de Rosa de Bengala (RBT) e o teste do Rivanol (RivT). Swabs de pele de todos os peixes e amostras de órgãos internos (fígado, rim e baço) de

todos os peixes sorologicamente positivos, foram cultivados para identificar *B. melitensis* biovar 3. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para confirmar os resultados. Um percentual de 9,2% e 8,3% das amostras de soro de bagre do Nilo foram positivas pelo RBT e RivT, respectivamente. Nenhuma das amostras de peixe-gato de viveiros foi soropositiva. *B. melitensis* biovar 3 foi isolada a partir de 5,8 %, 4,2 %, 5,8 % e 13,3 % de amostras de fígado, rim e baço e compressas de pele, respectivamente. Até o que se sabe, este é o primeiro relato de isolamento de *B. melitensis* biovar 3 de peixes de água doce. Os resultados sugerem que o peixe-gato do Nilo é naturalmente infectado com *B. melitensis* biovar 3 e pode desempenhar um papel importante na epidemiologia de brucelose (EL-TRAS, *et al.*, 2010).

SOBREVIVÊNCIA DO AGENTE NO HOSPEDEIRO

Nos animais a brucelose é uma infecção crônica que persiste por toda a vida. A sobrevivência de *Brucella* spp dentro do hospedeiro se baseia no fato deste agente ser uma bactéria intracelular facultativa, o que possibilita a permanência do microorganismo tanto dentro de células de defesa, ou circulantes no organismo, com a capacidade de iniciar e causar infecções, com mínimas perturbações no sistema imune inato do hospedeiro, podendo então se instalar em seus nichos privilegiados de multiplicação (GUERRA, 2007).

O LPS-S da *brucella* tem papel fundamental na sobrevivência intracelular. Comparado com o LPS das enterobacteriaceas o LPS-S da *brucella* tem baixa toxicidade para os macrófagos, baixa pirogenicidade e baixa atividade ferropênica. É também um fraco indutor do interferon e do fator de necrose tumoral, mas, paradoxalmente, é um indutor da interleucina 12 e dos linfócitos Th1 (ZHAN &, CHEERS, 1995; CARON *et al.*, 1994).

O sistema imune é um complexo de células e órgãos que tem a função de defender os indivíduos de invasores externos. A imunidade passiva é aquela recebida de forma natural, quando a mãe passa imunoglobulinas a sua prole, protegendo-a de infecções. Já a artificial é utilizada na forma de soros hiperimunes, que protegem os indivíduos de antígenos externos. A imunidade ativa é aquela que é desenvolvida pelo indivíduo a partir da presença de um antígeno ou patógeno que invade um organismo. A imunidade ativa natural se adquire através da exposição à microorganismos patogênicos, e a artificial é adquirida pela vacinação (TIZARD, 2002).

A exposição natural dos indivíduos ao gênero *Brucella* spp, induz tanto resposta celular, na qual os macrófagos têm o objetivo de destruir as bactérias, como resposta humoral, na qual as imunoglobulinas IgM estão presentes nas primeiras semanas de infecção, e IgG que se estabelecem, e persistem em animais cronicamente infectados (SUTHERLAND, 1980).

Depois de romper as barreiras das mucosas, *Brucella* spp. infecta a submucosa ou as células fagocitárias intra-epiteliais evitando as vias de transporte intracelular. Isto permite a *Brucella* spp. evadir dos mecanismos de proteção dos fagócitos do hospedeiro para estabelecer um nicho intracelular favorável à sobrevivência e replicação e para fornecer um meio de disseminação. A disseminação para órgãos distantes, especialmente aqueles dos sistemas retículo endotelial e reprodutivos mediados por células, ocorre por meio do sistema circulatório (PIZARRO-CERDA *et al*, 1998; ADAMS, 2002; PAPPAS *et al* , 2005; FRANCO *et al* , 2007).

A natureza intracelular da *Brucella* spp. favorece a sobrevivência e persistência por evasão da vigilância imune do hospedeiro. Em até 30% dos casos, a brucelose humana se desenvolve em uma doença crônica, muitas vezes acompanhada por uma combinação de febre ondulante e uma série de sintomas inespecíficos (ATLURI *et al*, 2011; SKENDROS *et al* 2011).

Brucella foi encontrada com sucesso colonizando e causando alterações patológicas em uma variedade de órgãos, incluindo os do sistema nervoso central, hemolinfático, digestivo, respiratório, reprodutor, músculo-esquelético, e os sistemas cardiovasculares, um aspecto que complica o diagnóstico e pode resultar em atraso de tratamento (FRANCO *et al*, 2007; MANTUR *et al*, 2007; GLYNN e LYNN, 2008; SELEEM *et al*, 2010; SKENDROS *et al* 2011).

O hospedeiro infectado, ao tentar defender-se através da ativação do sistema imune, comanda a primeira linha de defesa para tentar impedir a infecção de progredir dentro do organismo. Os macrófagos então fagocitam o agente na tentativa de defesa, porém a bactéria provoca desorganização na membrana e no metabolismo do macrófago, inviabilizando o ato de destruição bacteriana, através da não ligação do fagossoma com lisossoma, tornando o fagolisossoma impotente (ROY, 2005; CELLI, 2006; GORVEL & MORENO, 2002).

Uma vez internalizada, a *Brucella* localiza-se em um vacúolo que amadurece a partir de um endossomo primário até um endossomo tardio e, ao não ser destruída, continua a multiplicar-se no retículo endoplasmático dos macrófagos. No entanto, nem todas *Brucella* spp sobrevivem: quando as bactérias não são suficientemente numerosas e o animal tem um sistema imunitário competente, elas

são dirigidas para os lisossomas onde são destruídas e o complexo de histocompatibilidade principal apresenta à superfície da célula, os peptídeos a linfócitos Th1 e Th2 que vão induzir uma resposta imune (ARELLANO-REYNOSO *et al.* 2005, KUSUMAWATI *et al.*, 2000).

Ao evitar a degradação efetuada pelo macrófago, a bactéria se aloja no retículo endoplasmático desta célula de defesa, onde se multiplica e posteriormente se difunde no organismo, em busca dos sítios de sua predileção (GUERRA, 2007, CELLI, 2006). O seu substrato principal é um hormônio chamado Eritritol, envolvido principalmente na reprodução de mamíferos. Nas Fêmeas este hormônio é secretado em maior quantidade na gestação dentro do útero, já nos machos este hormônio é presente permanentemente nos testículos funcionais dos adultos (CARTER, 1991; SAMARTINO e ENRIGHT, 1996).

Os macrófagos são os responsáveis pela multiplicação e disseminação da bactéria até os órgãos corporais, como linfonodos, fígado, baço, medula óssea, glândula mamária, e órgãos sexuais (KO, *et al.*, 2003). A resistência da bactéria dentro de compartimentos ácidos dos macrófagos, e sua multiplicação utilizando o citoesqueleto da célula, não interrompem a função e o ciclo celular. Ao contrário do que se esperaria, o agente inibe a apoptose celular, propiciando a sobrevivência eterna e sua permanente replicação, causando infecções crônicas nos hospedeiros (PAPAS, *et al.*, 2006).

Quando a bactéria se instala no útero, na presença de eritritol sua multiplicação aumenta e a sobrevivência é garantida. Colonizando os tecidos, o agente causa necrose, vasculite e inflamação nas células epiteliais do córion, origina então, placentite e endometrite comprometendo as trocas metabólicas entre mãe e feto, podendo levar ao aborto, (GOMES, 2006) ou ao nascimento de terneiros fracos, e dentre estes neonatos alguns podem morrer após o nascimento. A brucelose é uma enfermidade de caráter crônico, se não houver intervenção terapêutica (OIE, 2007).

O aborto no terço final da gestação ocorre na maioria dos mamíferos, primoinfectados, sendo que nas espécies humana e equina não ocorre o aborto, por estas espécies não produzirem o eritritol no final da gestação, como os outros

mamíferos (NIELSEN e DUNCAN, 1990). Entretanto, Khan, Mah & Memish (2001) em uma revisão de 92 gestantes que se apresentaram com brucelose aguda em um hospital da Arábia Saudita, no período de 1983 a 1995, verificaram que a incidência cumulativa de gravidez com infecção brucélica foi de 1,3 casos por 1000 partos. A incidência de aborto espontâneo no primeiro e segundo trimestres foi de 43%, e a incidência de morte intra-uterina do feto no terceiro trimestre foi de 2%. Também Lord, Laserna & Meléndez (1986) na Venezuela examinando um total de 1.490 soros de equinos provenientes de fazendas onde estes animais compartilhavam os poteiros com bovinos e de haras com antecedentes de infertilidade, abortos e bursites, encontraram mais equinos (46%) reagentes positivos no grupo de animais procedentes de fazendas em comparação com os de haras (43%). *Brucella abortus* (biotipo 1) foi isolada a partir de baço, fígado, conteúdo estomacal de fetos abortados, exudatos de lesões com bursite e de swabes uterinos. Outros autores (DENNY, 1973; McCAUGHEY and KERR, 1967; SHOTRIDGE, 1967) também relatam aborto em éguas.

Segundo Samartino e Enright (1996), na segunda gestação após a infecção os animais produzem imunidade contra a bactéria, levando a gestação a termo com nascimentos de animais aparentemente saudáveis, que podem ser imunotolerantes e portadores silenciosos da bactéria por toda a vida. Estes animais não respondem aos testes de diagnóstico, por serem imunotolerantes à *Brucella* spp, o que dificulta o diagnóstico e a erradicação da doença.

SOBREVIVÊNCIA DO AGENTE NO AMBIENTE

A pasteurização e a fervura dos alimentos são medidas eficazes na destruição da bactéria, que não resiste a estas ações. Existem alguns desinfetantes comuns, que destroem as *Brucellas* spp rapidamente: o álcool à 70% (PAULIN, 2003), os compostos de creosol à 3%, os desinfetantes clorados à 2,5%, os compostos de ortofenol à 2,5%, e soluções de formaldeído à 2%, destroem o microorganismo após 15 minutos de exposição. A multiplicação desta bactéria não é possível fora de um hospedeiro, portanto sua resistência no ambiente é influenciada por condições ambientais favoráveis ou não (CASTRO, *et al*, 2005). Entretanto, sete anos após o isolamento primário da *B. microti* de ratazanas comuns, conseguiu-se isolar do solo do mesmo local onde residiam as ratazanas, novamente a *B. microti*. Também foi isolada *B. microti*, a partir das mesmas amostras de solo, armazenadas a 4°C após seis meses. Esta descoberta indica sobrevivência a longo prazo de *B. microti* no solo, assim, o solo pode funcionar como um reservatório de infecção. Se o solo é o habitat primário da *B. microti* ou outros vetores, como nematóides, continua a ser investigado (SCHOLZ *et al*. 2008c). A identificação da *B. microti* como uma potencial bactéria do solo é consistente com a seqüência do genoma de *B. suis*, que apresenta semelhanças fundamentais com patógenos de plantas, tais como *Agrobacterium* spp. e *Rhizobium* spp. (PAULSEN *et al*. 2002).

A *Brucella* spp pode persistir por longos períodos na água, esterco, poeira, lama, fetos abortados, solo, carne e produtos lácteos, e sua duração exata, depende de variáveis como natureza do substrato, temperatura, pH, número de microorganismos, luz solar e presença de outros microorganismos contaminantes (CORBEL, 2006).

Em ambiente com condições favoráveis, a bactéria é capaz de sobreviver, em diversas superfícies e meios de veículo. Em superfícies sólidas, na temperatura média de 31°C o microorganismo permanece viável durante 4 a 5 horas com incidência solar. Na água veiculada nas torneiras a bactéria é capaz de permanecer

viva por 114 dias na temperatura média de 4°C. Em coleções de águas tipo lago, em temperatura média de 8°C, pode permanecer viável por mais de 57 dias, se o pH 6,5 se mantiver constante. O solo seco em temperatura de aproximadamente 20°C limita a sobrevivência da bactéria para menos de 4 dias. Em contrapartida em solo molhado a menos de 10°C a duração do agente é de 66 dias (CORBEL, 2006).

A capacidade de permanência de *Brucella abortus* nos restos fetais e no feto abortado em pastagens é de seis meses ou mais, sendo possível o aumento deste tempo se este material estiver em condições favoráveis como sombra, umidade e baixas temperaturas (BRASIL, 2006).

Nos dejetos dos animais, como o esterco, na estação do verão a bactéria tem duração de somente um dia, porém no inverno no mesmo meio permanece 53 dias viável. Pesquisando o chorume de animais de fazenda, foi possível encontrar o microorganismo em temperatura ambiente após 7 semanas de depósito, que aumentou para 8 meses na temperatura média de 12°C (CORBEL, 2006).

A permanência da bactéria em leite ácido pode ser de vários dias, por semanas em sorvetes e meses na manteiga. A carne ingerida de forma mal cozida também porta a bactéria viável. O hábito de comer fetos abortados foi relatado no Equador, sendo caracterizado como promotor de Brucelose humana (GODFROID, *et al*, 2005).

Os produtos lácteos e o leite podem conter bactérias viáveis por vários dias, conforme a temperatura, atividade de água e pH destes líquidos, como já comprovado em queijos moles com alta atividade de água (NASCIMENTO *et al*, 2002).

EPIDEMIOLOGIA

A Brucelose é uma doença de distribuição mundial e tem grande ocorrência nos países mediterrâneos da Europa e África. Na Ásia central e no Oriente médio, assim como no restante do continente Africano a enfermidade também está distribuída. Na América do Sul a doença se expressa do México ao Extremo Sul do Continente (LAWINSKY, 2010).

Países onde não ocorrem casos de Brucelose durante cinco anos consecutivos, são considerados locais onde a doença está erradicada. Alguns exemplos de países são: Reino Unido, Suécia, Austrália, Canadá, Chipre, Holanda, Finlândia, Dinamarca, Noruega e Nova Zelândia (ROBINSOM, 2003).

No Brasil a Brucelose é uma enfermidade de caráter endêmico, e apesar de apresentar prevalências diferentes nos estados, ocorre em todo o Território Nacional. Em 1975 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizou um levantamento estimando as prevalências regionais para a enfermidade, os percentuais encontrados foram de 4,1% no Norte do país, 2% no Nordeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 7,5% na região Sudeste e 4% na região Sul (POESTER *et al*, 2002). Estudos realizados entre as décadas de 80 e 90 nas mesmas regiões revelaram prevalências semelhantes às encontradas em 1975 (BRASIL, 2006).

Quase todas as espécies domésticas podem ser afetadas com brucelose exceto gatos que são resistentes à infecção por *Brucella*. Também é um grande impedimento para o comércio. A morte pode ocorrer como resultado de metrite aguda, seguida de retenção das membranas fetais (RADOSTITS *et al.*, 2000).

O caráter ocupacional da Brucelose é comprovadamente predominante, sendo que profissionais como veterinários, magarefes, trabalhadores agrícolas, rurais e profissionais de laboratório são os principais acometidos, entretanto os humanos são considerados portadores acidentais (LOUISIANA, 2008).

Hospedeiros Susceptíveis

Os principais hospedeiros da Brucelose são animais produtores de alimento para os homens, por este motivo a sua importância como zoonose. Entre estes estão incluídos os bovinos, ovinos, suínos e caprinos. Outros animais também podem ser citados, como os equinos, cães, búfalos, camelos, renas e diversos mamíferos silvestres, de maior ou menor importância dependendo da região onde se localizam. Alguns mamíferos marinhos já foram diagnosticados portando a bactéria, entre eles, as focas, golfinhos, baleias e leões marinhos, que representam um risco real para os expostos ao contágio estreito com estes animais (CORBEL, 2006).

O homem é um hospedeiro susceptível, que contrai a Brucelose de forma natural e/ou acidentalmente. Muitos casos da doença adquiridos em manipulação laboratorial são relatados na atualidade e revelam o despreparo geral que existe na manipulação correta do microorganismo. A *Brucella* spp é uma bactéria que pertence a classe 3, ao nível de biossegurança, e a infecção adquirida em laboratório comprova a verdadeira ameaça biológica que envolve este microorganismo, inclusive como potencial agente de bioterrorismo (YAGUPSKY & BARON, 2005).

A ocorrência ocupacional desta doença indica o homem novamente como hospedeiro susceptível. Os veterinários, magarefes, trabalhadores rurais, produtores de leite, incluindo diversas pessoas que possam ter contato direto com animais, fazem parte dos possíveis hospedeiros da *Brucella* sp (SEIMENIS, et al., 2006).

Incubação da doença

O período de incubação da doença é bastante variado, ocorrendo em menos de uma semana, e estendendo-se por vários meses. Entretanto após três ou quatro semanas de exposição é comum o aparecimento dos sintomas da enfermidade (OIE, 2007). A transmissão ao homem se dá através de contato com secreções vaginais e teciduais, fetos abortados, urina, sangue, placenta e inclusive produtos lácteos não pasteurizados provenientes de animais infectados (Louisiana, 2008). Segundo Bossi, *et al.* (2004), a incubação da Brucelose é altamente variável, que se estende na faixa de um à 60 dias, ou estendendo-se por vários meses.

Nos bovinos a incubação da Brucelose, ocorrida a partir de infecção natural, é difícil de ser mensurada, porém observa-se que quanto mais adiantada a prenhes

em fêmeas infectadas, mais curto será o período de incubação, com conseqüente aborto ou nascimento prematuro (OIE, 2008).

Segundo a Organização Internacional de Epizootias, no desenvolvimento da Brucelose, pode ocorrer um período extremamente longo de incubação da doença, ou também os indivíduos infectados podem permanecer sorologicamente negativos, após a infecção, por períodos consideravelmente longos. Os portadores falsamente negativos, neste caso, permanecem um grande risco de tornarem-se fonte de infecção silenciosa, para o grupo de risco em contato (CORBEL, 2006).

Fonte de infecção

Os reservatórios naturais da Brucelose são os mamíferos em geral, como os bovinos, os caprinos, suínos, ovinos, cães e equinos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003). Os animais silvestres também podem abrigar esta bactéria e são importantes reservatórios da doença além dos animais domésticos (POESTER *et al*, 2002).

A estimativa de dose infectante de *Brucella* spp em forma de aerossóis infecciosos para seres humanos é de 10 a 100 microorganismos inalados (CHARISSIS *et al*, 2009).

Os equinos têm seu papel de reservatório da Brucelose bem amplificado na zona rural, pelo fato destes animais servirem o homem ajudando no manejo das propriedades. O acesso dos eqüinos abrange praticamente todos os poteiros da propriedade, propiciando a possível disseminação da doença caso o animal esteja infectado. A Brucelose pode se apresentar de forma assintomática na sua fase inicial, silenciosamente em muitos casos. Nos equinos em fase crônica é comum o aparecimento de inflamação supurativa na cernelha dos animais, sendo conhecido como sinal patognomônico de Brucelose equina, e denominado “Mal das Cruzes” (STARK, *et al.*, 2008)

Os caninos positivos para Brucelose são fonte de infecção permanente, sendo que seu tratamento não é indicado, devem ser removidos do contato com outros animais, não utilizados em reprodução e castrados. O contágio para humanos não é freqüentemente relatado, porém pode ocorrer, sendo a urina dos animais, um potente disseminador da bactéria após quatro a oito semanas de infecção, tanto

para animais como humanos em contato estreito com os soropositivos.(WANKE, 2004).

Fontes de contaminação

Alimentos provenientes de leite não tratado com fervura ou pasteurização, legumes e verduras contaminados com excretas de animais doentes, águas de poços e cisternas contaminadas por excrementos de animais enfermos, carnes e vísceras de animais portadores do agente, que pode permanecer viável nestes produtos por semanas, são fontes de contaminação para homes e animais (NIELSEN,1997).

As principais fontes de contaminação para bovinos são os fetos abortados, envoltórios fetais e descargas vaginais após o aborto, que permanecem nos campos, assim como as fezes de animais infectados. Como os bovinos costumam lambe estes despojos fetais, este hábito bovino se torna uma importante fonte de contaminação (SAMARTINO & ENRIGHT, 1993).

Embora os machos não apresentem importância relevante na transmissão da Brucelose por monta natural, em decorrência da eficácia das proteções naturais da vagina da fêmea, a inseminação artificial com sêmen de touros infectados é uma prática que pode também ocorrer e propagar a Brucelose (CAMPERO, 1993).

A contaminação de instalações, pastos, copos de ordenha, “pool” de colostro administrado à recém nascidos, são carreadores da bactéria e fontes de contaminação. Uma forma moderna de ter contato com fontes de contaminação da doença é a utilização de produtos orgânicos, “alimentos saudáveis”, onde a ingestão de vegetais crus, por exemplo, pode ser potencialmente perigosa, perpetuando a transmissão da doença nos tempos modernos (CORBEL, 2006).

Vias de Transmissão

A transmissão da Brucelose animal pode ocorrer tanto de forma horizontal, como de forma vertical, cursando com aborto e infertilidade nos hospedeiros naturais, como bovinos, suínos, caprinos, e também em animais domésticos e silvestres que podem servir de reservatório da doença para os humanos e outros animais (APARÍCIO, 2013).

As possíveis vias de transmissão da doença podem originar-se do contato sexual entre parceiros, aquisição da infecção em ambiente contaminado com fômites, exposição ocupacional no contato com animais e transmissão de origem alimentar (CORBEL, 2006).

O consumo de produtos não pasteurizados é apontado como o maior causador da Brucelose humana. Existem constatações que a transmissão sexual da enfermidade entre parceiros, seja possível de ocorrer, e a transmissão por aleitamento já foi comprovada entre lactantes e sua prole. (KATO, 2007). A Brucelose pode ser transmitida ainda por transfusão de sangue, transplante de rins, transplante de medula óssea e através do sêmen contaminado (MANTUR, *et al* 1996).

Os aerossóis inalados pelos homens e animais podem propagar a Brucelose. A utilização de centrifugação de sangue, não hermeticamente fechado, pode originar infecção por inalação da bactéria acidentalmente, assim como os aerossóis circulantes em matadouros de bovinos (NIELSEN, 1997).

Os trabalhadores de laboratórios que manipulam a bactéria estão potencialmente em risco de transmissão da Brucelose. A exposição natural à poeira e esterco contaminados, superfícies contaminadas com dejetos de animais, águas de poços onde ocorreram recentemente aborto, assim como água da chuva contaminada e espalhada em jardins, ruas e estabelecimentos, são importantes veículos de transmissão da Brucelose humana e animal (CORBEL, 2006).

SINAIS CLÍNICOS

A Brucelose cursa com dor de cabeça, febre, prostração, dores articulares, suores profusos com odor característico, anorexia, dores musculares, emaciação, artrite, esplenomegalia e hepatomegalia (YOUNG, 2000).

Outros sintomas são vulgarmente conhecidos, por fazerem parte dos sinais de Brucelose e compreendem: suores noturnos, astenia, tremores musculares, irritabilidade, artralguas, mialgias e lombalgias, somados ao descritos anteriormente (NARCISO *et al*, 1991). Raramente podem ocorrer sintomas, como problemas renais, hepáticos e manifestações cardíacas. Quando o sistema nervoso central é envolvido na infecção pode ocorrer síndrome de desmielinização nervosa. (OIE, 2008).

A febre que ocorre na Brucelose é expressa de forma intermitente e recorrente, e acompanha a conhecida “Síndrome da Fadiga Crônica”, que na ausência de diagnóstico e tratamento pode persistir semanas ou meses (CORBEL, 2006).

A sintomatologia da Brucelose humana pode também ser inexpressiva, ou seja, assintomática, não obstante ocorra bacteremia, sendo possível independentemente deste fato, a transmissão do agente para indivíduos próximos ou familiares do mesmo grupo de risco (ÇELEBI, 2007).

Na Brucelose bovina a principal manifestação clínica é o aborto no terço final da gestação para as fêmeas, com nascimentos prematuros, retenção de placenta, podendo gerar infertilidade permanente, e nos machos apresenta-se em geral assintomática, cursando com inflamação aguda, que se torna crônica despercebidamente (OIE, 2008).

As fêmeas adultas bovinas são as principais acometidas pela enfermidade, porém os animais jovens e fêmeas não gestantes são afetados em menor grau. A brucelose pode difundir-se rapidamente nos rebanhos e causar desta forma grandes

perdas econômicas com suas consequências, como abortos, nascimentos prematuros e esterilidade nas vacas enfermas (SAMARTINO e ENRIGHT, 1993)

Os machos acometidos de Brucelose apresentam sintomas principalmente nos órgãos genitais, que se manifestam como orquite, epididimite, alterações nas glândulas genitais (JÚNIOR, *et al* 2012), diminuição de libido e infertilidade, podendo apresentar ainda artrites e higromas, que são coleções de líquido inflamado nas articulações dos enfermos (OIE, 2008).

PATOGENIA

O potencial patogênico de *Brucella* spp. é altamente dependente da sua capacidade de entrar e sobreviver no interior das células hospedeiras. *Brucella* não tem fatores de virulência clássicos como exotoxinas, cápsula ou lipopolissacarídeo endotóxico (LPS) (MORENO and, MORIYÓN, 2001). Os principais mecanismos de virulência da *Brucella* já identificados são os necessários para a invasão da célula hospedeira e sobrevivência intracelular ou replicação (BOSCHIROLI *et al.* 2002, LÓPEZ-GOÑI *et al.*, 2002, LAPAQUE *et al.* 2005).

Os genes que codificam a urease são necessários para o estabelecimento da infecção por *B. suis*, *B. abortus*, e *B. melitensis* (PAIXÃO *et al.* 2009, BANDARA *et al.* 2007, SANGARI *et al.* 2007). A urease é uma enzima de subunidades múltiplas, envolvida no metabolismo do azoto, o que provoca um aumento do pH devido a produção de amoníaco, como resultado da hidrólise da uréia (COLLINS and D'ORAZIO 1993). O papel da urease brucélica na inibição da acidificação do fagossoma por amoníaco não tem sido demonstrado (SANGARI *et al.*, 2007). Aparentemente, o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) e LPS também são necessários para o estabelecimento da infecção gastrointestinal, embora cepas mutantes ainda tenham capacidade de atravessar a mucosa intestinal através das células M, semelhantes às cepas virulentas (PAIXÃO *et al.* 2009). A hidrolase de sal biliar pode ser outra enzima bacteriana essencial para *Brucella* infectar camundongos por via oral. A deleção do gene da hidrolase choloylglycine em *B. abortus*, provoca perturbações do crescimento bacteriano em meio contendo sais biliares e atenuação em camundongos após 10 dias de infecção intragástrico (DELPINO *et al.* 2007).

Durante a internalização, *Brucella* depende de um sistema regulador de dois componentes, BvrR/BvrS que regulam a expressão de proteínas da membrana externa (OMPs) envolvidas na invasão das células hospedeiras. Os dois componentes deste sistema são BvrR, uma proteína reguladora, e BvrS, uma proteína com atividade de sensor de histidinoquinase. Este sistema regulador é

necessário para o recrutamento de GTPases e filamentos de actina, e para manter a integridade da membrana externa bacteriana (LÓPEZ-GOÑI *et al.* 2002, GUZMAN-VERRI *et al.* 2002). Estirpes mutantes onde faltam BvrR/BvrS não são capazes de invadir células fagocíticas e não fagocíticas porque não recrutam GTPases, particularmente Cdc42. Este sistema regulador também é importante para a sobrevivência intracelular, já que cepas mutantes são incapazes de inibir a fusão fagossoma-lisossoma (LÓPEZ-GOÑI *et al.* 2002, SOLA-LANDA *et al.* 1998).

Um mecanismo adicional empregado pela *Brucella* para evitar a fusão das bactérias contendo o vacúolo com lisossomos em macrófagos são as cíclicas β 1,2-glucanas (ARELLANO-REYNOSO *et al.* 2005). As glucanas são constituintes do periplasma bacteriano com atividade osmorregulatória e sequestrante do colesterol e são necessárias para a sobrevivência de *Brucella* em células não fagocíticas e in vivo em camundongos. As Cíclicas β 1,2-glucanas de *Brucella* impedem a maturação do fagossoma, interferindo com as jangadas lipídicas, alterando, assim, a expressão da proteína na membrana vacuolar e excluindo as proteínas lisossômicas do Vacúolo Contendo *Brucella* “BCV” (STARR *et al.* 2008, ARELLANO-REYNOSO *et al.* 2005, BRIONES *et al.* 2001).

O LPS é outro fator de virulência da *Brucella* que contribui para a sobrevivência inicial das bactérias nos macrófagos (LAPAQUE *et al.* 2005). O LPS é essencial para a integridade estrutural e funcional da membrana externa de bactérias gram-negativas. A caracterização do fenótipo LPS de *Brucella* spp. como liso ou rugoso depende da presença ou ausência da cadeia O do polissacarídeo exposto à superfície, respectivamente. O polissacarídeo-O desempenha um papel importante na virulência associado com o LPS de estirpes lisas uma vez que as cepas mutantes rugosas não conseguem sobreviver em culturas de macrófagos, bem como in vivo em camundongos (LAPAQUE *et al.* 2005, ALLEN *et al.* 1998, JIMENEZ de BAGUES *et al.* 2004). Embora mutantes rugosas derivadas de estirpes virulentas de *Brucella* lisas geralmente invadam células hospedeiras de forma mais eficiente do que as estirpes lisas, elas são menos capazes de sobreviver dentro da célula. No entanto, algumas cepas rugosas podem ser naturalmente virulentas (DETILLEUX *et al.* 1990a, DETILLEUX *et al.* 1990b). A replicação intracelular de cepas de *Brucella* lisas pode refletir o papel do LPS liso no início do desenvolvimento do fagossoma contendo *Brucella*. *Brucella* pode bloquear

maturação do fagossoma através da interação de LPS liso com balsas lipídicas, o que contribui para a inibição da fusão fagossoma-lisossoma (PORTE *et al.* 2003). Além disso, o LPS liso oferece resistência ao complemento e peptídeos antimicrobianos, como α -defensinas e lactoferrinas (LAPAQUE *et al.* 2005, de TEJADA *et al.* 1995, FERNANDEZ-PRADA *et al.* 2001, TUMURKHUU *et al.* 2006). O LPS liso também confere resistência ao óxido nítrico, radicais livres, e lisozima, importantes mecanismos antibacterianos de macrófagos e neutrófilos (LAPAQUE *et al.* 2005, ALLEN *et al.* 1998, RILEY *et al.* 1984, RASOOL *et al.* 1992, FERNANDEZ-PRADA *et al.* 2001). Portanto, o LPS de *Brucella* lisa pode ser considerado um fator de virulência necessário para a resistência contra ambos os mecanismos antimicrobianos extra e intracelulares do hospedeiro.

A principal via de entrada da bactéria no organismo é a via oral, porém o microorganismo pode penetrar no organismo através de portas de entrada como ferimentos na pele, ou através das mucosas expostas às mãos contaminadas, assim como os aerossóis podem também portar a bactéria para o trato respiratório do susceptível (NIELSEN & DUNCAN, 1990).

Para alcançar suas células-alvo, a *Brucella* precisa atravessar as barreiras das mucosas do trato respiratório, trato geniturinário ou digestivo, onde se submete a fagocitose por macrófagos residentes e células dendríticas, resultando na disseminação do organismo para órgãos linfóides e reprodutivos (ANDERSON *et al.*, 1986; ACKERMANN *et al.* 1988). A invasão através do trato digestivo está associada à transmigração epitelial de bactérias preferencialmente através de células M. Fagócitos intra-epiteliais também podem transportar a *Brucella* do lúmen intestinal para a lâmina própria (ACKERMANN *et al.* 1988; PAIXÃO *et al.* 2009).

Após a entrada em células de mamíferos, o patógeno intracelular *Brucella abortus* reside dentro de um compartimento ligado à membrana, o vacúolo que contém a *Brucella* (BCV), cuja maturação é controlada pela bactéria gerando uma organela replicativa derivada do retículo endoplasmático (RE). Antes de atingir o RE, acredita-se que a *Brucella* garanta a sua sobrevivência intracelular através da inibição de fusão do BCV intermediário com endossomas e lisossomas tardios, embora tais BCVs sejam ácidos e acumulem a proteína associada à membrana lisossomal (LAMP-1). Os BCVs adquirem rapidamente vários marcadores

endocíticos tardios, incluindo a Rab7 guanosina trifosfatase e seu efetor a proteína lisossomal interagindo com Rab (RILP), estando acessíveis para os marcadores de fase fluida tanto os liberados na totalidade da via endocítica como os pré-carregados pelos lisossomas, indicando que BCVs interagem com endossomos e lisossomos tardios. Consistentemente, BCVs intermediários são ácidos e exibem atividade proteolítica até 12 h após a infecção. A expressão da dominante negativa Rab7 ou a superexpressão da RILP significativamente prejudicam a capacidade das bactérias para converter seu vacúolo em uma organela replicativa derivada do RE, indicando que a maturação do BCV exige interações com os compartimentos funcionais endossomal/lisossomal tardios. Tomados em conjunto, estes resultados demonstram que o tráfego dos BCVs ao longo da via endocítica se funde com os lisossomas e os eventos de tal fusão são necessários para a posterior maturação dos BCVs em organelas replicativas derivadas de RE (STARR *et al.* 2008).

Ao penetrar no organismo dos indivíduos a bactéria vai infectar os gânglios regionais para multiplicar-se em maior escala, sendo levada pela linfa e sangue para outros órgãos. A bacteremia sanguínea pode ocorrer quinze dias após a infecção inicial (OIE, 2008). A localização preferencial da *Brucella* spp são os gânglios linfáticos, útero e úbere, fígado e baço, e órgãos genitais dos touros (KO & SPLITTER, 2003).

Também é citado que a *Brucella* spp ao passar por diferentes hospedeiros, conquistou uma evolução única em sua sobrevivência dentro destes hospedeiros, e a infecção causada pela bactéria possui pelo menos duas etapas distintas. No estágio infeccioso inicial da enfermidade ocorre o aumento do número de bactérias, passando após para uma fase de latência bacteriana que assegura sua sobrevivência e infecção generalizada. Efetua-se assim a garantia de seu ressurgimento em momento oportuno e perpetuação da transmissão da doença (HALLING & BOYLE, 2002).

DIAGNÓSTICO

O "padrão ouro" no diagnóstico da brucelose é o teste bacteriológico direto: cultivo de *Brucella*, isolado a partir de fluidos corporais (sangue, líquido, urina e outros) ou tecidos (YAGUPSKY, 1999). A identificação das bactérias é baseada em sua morfologia, coloração e do perfil metabólico (testes para as atividades de catalase, oxidase e urease) (GODFROID *et al.*, 2010). Recomenda-se para sangue e outros fluidos corporais a cultura pelo método Bifásico de Castañeda (POESTER *et al.* 2010). O diagnóstico bacteriológico de brucelose é severamente limitado pelo fato de que *Brucella* é uma bactéria perigosa, e seu isolamento tem de ser feito especialmente em laboratórios equipados com nível de biossegurança 3. Além disso, é um procedimento demorado e muito trabalhoso. No entanto, o isolamento e cultivo de bactérias também são passos preliminares necessários para a coloração e biotipagem de espécies de *Brucella* (SMIRNOVA *et al.* 2013).

O Isolamento da bactéria do sangue, gânglios linfáticos, medula óssea e líquido cérebro espinhal é considerado como de alta especificidade, porém com desvantagens como baixa sensibilidade e crescimento lento no cultivo laboratorial (GLYNN & LYNN, 2008). O isolamento primário além de ser difícil e demorado, requer meios de cultura especiais, e nível 3 de segurança biológica, representando risco para o manipulador das amostras em laboratório, por este motivo, a confirmação da brucelose é baseada principalmente em sorologia (YOUNG, 1991).

A bacteriologia da Brucelose animal pode ser realizada utilizando-se amostras de feto abortado, exsudatos de abscessos e uterino, envoltórios e líquidos fetais, e leite (CORBEL, 2006). A incubação destas amostras maceradas e inoculadas em cobaias por três a seis semanas preconiza o imediato abate e isolamento do agente do baço, testículos, linfonodos regionais e fígado. O soro retirado dos cobaios é submetido à sorologia pertinente, para final confirmação do diagnóstico. (OCHOLI, *et al.*, 2004)

O exame direto no diagnóstico da Brucelose pode ser realizado utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta. As amostras podem ser retiradas de fetos,

secreções vaginais e membranas fetais (OIE, 2007) O teste envolve a fixação (por acetona) de uma suspensão pré-determinada do conjunto *B. abortus* ou células *B. melitensis* obtidos a partir de diferentes fontes comerciais ou laboratórios de referência.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular, que permite a identificação de um microorganismo através do seu DNA. Os indicadores utilizados chamam-se “Primers” e através da amplificação desta sequência de DNA, é possível identificar o microorganismo presente na amostra. A evolução da biologia molecular permitiu este avanço em diagnóstico humano e animal e popularização de técnicas moleculares. Estes testes são extremamente sensíveis e específicos e permitem a identificação da *Brucella* spp em diversas amostras, desde os restos de aborto até alimentos como o queijo. A necessidade de técnicos especializados, e laboratórios equipados são essenciais para a realização do PCR, o que dificulta a sua popularização mais efetiva (POESTER, *et al*, 2005).

A sorologia para Brucelose é baseada na utilização de antígenos formulados com suspensão de bactérias totais, desenvolvidos para detectar anticorpos contra a cadeia O do LPS-S, que faz parte da membrana externa da bactéria juntamente com fosfolipídeos e proteínas. Os testes sorológicos mais utilizados são o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), o Teste de Soro-aglutinação Lenta (SAL) que é utilizado em conjunto com o Teste do 2 Mercaptoetanol (2ME), o Teste do Anel no Leite (TAL), o Teste de Fixação de Complemento (FC), e testes de ELISA (CORBEL, 2006).

O Teste de Polarização da Fluorescência (FPA) é a técnica mais moderna na realização do diagnóstico da Brucelose bovina, e já está sendo implantada em vários países (POESTER, *et al* 2005), inclusive no Brasil. Este teste de diagnóstico da doença, é recomendado pela OIE como teste alternativo, para o mercado internacional de bovinos (NIELSEN, *et al*, 2002). O antígeno (AG) utilizado no teste é um fragmento do polissacarídeo O LPS-S da *Brucella abortus*, marcado com fluorocromo de baixo peso molecular. Quando o AG é adicionado, a soros ou fluídos a serem testados, se liga aos anticorpos se estiverem presentes. O FPA é baseado na rotação aleatória de moléculas em solução, sendo que na presença do complexo antígeno-anticorpo, ocorre a diminuição da rotação das moléculas, que pode ser

medida através da fluorescência destas em plano de luz polarizada (NIELSEN e GALL, 2001).

No ano de 2001 foi instituído no Brasil, pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o PNCEBT, que é um programa que visa erradicar duas doenças tão importantes em saúde pública e animal, como a Brucelose e Tuberculose. Até dezembro de 2003 foi estabelecido o prazo, para que todos os Estados do país realizassem a vacinação obrigatória contra Brucelose. As fêmeas dos rebanhos na idade de três a oito meses de vida, obrigatoriamente devem ser vacinadas, implantando assim uma das metas do programa. O objetivo do programa visa diminuir o impacto negativo dessas zoonoses em saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional. A vacinação das fêmeas e o diagnóstico em idade adulta compõem as estratégias de certificação de propriedades livres ou monitoradas, na luta contra Brucelose bovina e bubalina (BRASIL, 2006).

No Brasil o PNCEBT está em funcionamento, padronizando e regulando o diagnóstico da doença em bovinos. Os objetivos específicos do programa são baseados na redução da prevalência e incidência de novos focos da doença. O programa foca também, na criação de propriedades certificadas como livres ou monitoradas para Brucelose, que possam oferecer aos consumidores, produtos alimentícios de baixo risco sanitário (BRASIL, 2006).

Os testes de diagnóstico preconizados pelo PNCEBT são divididos em categorias segundo sua função epidemiológica. O teste de vigilância epidemiológica, utilizado na triagem para Brucelose em vacas leiteiras que estejam em lactação, é o TAL (POESTER, 2005). As vantagens do teste são a rapidez de execução, o grande número de animais testados com o mix do leite total da propriedade, e a retirada da amostra de leite do tanque refrigerado da propriedade, sem contato com as vacas lactantes, evitando o estresse nos animais. O aparecimento de animais falsos positivos pode ocorrer se na realização da prova, suas normas forem negligenciadas (NIELSEN, 2002).

A triagem para Brucelose bovina no Brasil é realizada com o teste AAT, que é um teste sorológico individual, com alta sensibilidade, de rápida execução e baixo custo, amplamente utilizado no diagnóstico da doença (CORBEL, 2006). A prova do

AAT é de característica qualitativa, pois não revela quantidades de anticorpos e sim a sua presença ou ausência, levantando com maior precocidade a presença de infecções recentes sendo neste sentido superior ao 2ME e SAL (PAULIN, 2003).

Os testes confirmatórios para Brucelose são a SAL e 2ME, realizados em conjunto para a mesma amostra segundo o PNCEBT. O levantamento da presença de anticorpos é qualitativo, e através deste conjunto são verificadas a presença de IgM decorrente de infecções recentes e títulos vacinais, e IgG que indica infecção ativa ou crônica, e revela a positividade para a doença. A sua comprovação positiva determina o Abate Sanitário dos animais positivos em 30 dias, e Notificação Compulsória aos órgãos de Inspeção Federal responsáveis pela zona sanitária, onde ocorreu o diagnóstico da doença (BRASIL, 2006). Esta prova possui alta especificidade, característica de testes confirmatórios, apesar de não necessitar de alta sofisticação para sua realização, é eleita prova confirmatória para Brucelose animal (POESTER, *et al.* 2005).

O teste de FC é recomendado pela OIE como teste de referência para trânsito internacional de bovinos (OIE, 2008). Este teste é preconizado também pelo PNCEBT como teste de referência para Brucelose para transito internacional, porém não é utilizado amplamente na rotina de detecção de Brucelose, diferentemente do 2ME e SAL (BRASIL, 2006). A prova revela tanto a presença de IgM, como IgG, porém é um teste complexo e trabalhoso, que exige equipes treinadas e laboratório bem equipado (CORBEL, 2006; NIELSEN, 2002).

No Brasil o PNCEBT determinou como testes oficiais de triagem o AAT e o TAL e como testes confirmatórios o 2ME e FC, sendo a amostra de *Brucella abortus* 1119-3 utilizada na preparação dos antígenos específicos para realização dos testes (MEGID *et al.*, 2000).

Vários fatores devem ser levados em consideração, na escolha dos testes de diagnóstico para cada região do planeta. Na escolha dos métodos de sorologia deve-se levar em consideração, o custo de cada teste, a situação epidemiológica da doença, o tamanho da população bovina da região e suas características, se a vacinação é utilizada na região, e qual tipo de vacina é inoculada no rebanho, como também a sensibilidade e especificidade dos testes a serem realizados no rebanho (BRASIL, 2006). A efetivação da erradicação ou controle da Brucelose bovina é

fundamental no controle da Brucelose humana, e de grande importância nacional e internacional, sendo esta enfermidade uma doença tão importante em saúde e zoonose de periculosidade considerável, os avanços em busca de sua erradicação são sempre de suma importância (NIELSEN, 1990).

Restrições ao diagnóstico de Brucelose surgem em zonas, onde o poder aquisitivo dos proprietários é baixo, e ao serem diagnosticados animais positivos nestes locais, a venda destes para outros produtores pode ocorrer, na tentativa de evitar perdas econômicas, inviabilizando a efetivação de programas de erradicação da doença (SILVA *et al*, 2000).

O aparecimento de reações falso positivas no diagnóstico de Brucelose pode ocorrer. A causa mais provável é a bactéria *Yersinia enterocolitica* O:9 que possui epítomos semelhantes à *Brucella abortus*, da qual é feito o antígeno para o diagnóstico em bovinos. Desta forma as imunoglobulinas identificadas pelos testes são equivocadas, caso estejam presente anticorpos contra *Yersinia* spp no momento do diagnóstico (KITTELBERGER *et al*. 1995). Outras bactérias podem causar reação cruzada e resultados falsos positivos para Brucelose, entre elas estão a *Escherichia coli* O:157, *Salmonella urbana* O:30, *Vibrio cholerae*, e a *Francisella tularensis*, sendo estas as mais citadas, segundo a Organização Internacional de Epizootias (CORBEL, 2006).

A adesão ao PNCEBT é voluntária, não sendo este um programa apenas do governo federal ou estadual, vários setores são envolvidos para que o programa seja efetivo. O setor produtivo, o setor industrial, as comunidades e seus consumidores, como também os médicos veterinários atuantes no programa que são agentes do setor privado. O objetivo é de que toda cadeia produtiva seja envolvida neste grande projeto, visando à saúde pública e animal nacional, com erradicação da Brucelose e progresso agropecuário concreto (BRASIL, 2006)

TRATAMENTO HUMANO

A recomendação para o tratamento atual da Brucelose em humanos tem dois pilares importantes, que incluem a terapia medicamentosa, associada a um curso longo de tratamento contínuo. Para que esta combinação seja efetiva na eliminação da enfermidade, atenção especial deve ser dada ao controle eficaz da bactéria, que previne complicações e possíveis recaídas características da Brucelose. Para tanto, recomenda-se principalmente os seguintes fármacos: Tetraciclina, Rifampicina, Trimetoprim-Sulfametoxazol, os Aminoglicosídeos, e as Quinolonas. (POURBAGHER *et al.* 2006)

A capacidade de adaptação ambiental da bactéria dentro de seu nicho de replicação, que são os macrófagos, nos quais ela resiste intracelularmente, interfere na eficácia do tratamento e no aumento das recidivas da doença, sendo indicada então a combinação de fármacos e efetiva adesão dos pacientes ao tratamento para elevar a taxa de recuperação humana (SELEEM *et al.*, 2008).

A Brucelose continua a ser a mais comum antropozoonose em todo o mundo, e seu tratamento é complexo, exigindo administração prolongada de mais de um antibiótico. Em novembro de 2006, um encontro de consenso que visava chegar a uma declaração comum de especialistas no tratamento da brucelose foi realizado em Ioannina, Grécia sob os auspícios da International Society of Chemotherapy e do Instituto de Continuing Medical Education de Ioannina. O painel sugeriu que o tratamento ideal da brucelose simples deve basear-se num regime de seis semanas de doxiciclina combinado tanto com estreptomicina por 2-3 semanas, ou rifampicina durante seis semanas. Gentamicina pode ser considerada uma alternativa aceitável à estreptomicina, enquanto que todos os outros regimes e/ou combinações devem ser considerados de segunda linha. O desenvolvimento de uma comum linguagem terapêutica global para brucelose humana, e no futuro, ensaios clínicos realizados corretamente iriam resolver controvérsias em relação à doença (ARIZA *et al.* 2007).

Na ocorrência da doença, utilizando-se o tratamento adequado, quase todos os pacientes alcançam a recuperação, sendo, que 10% dos enfermos sofrem

recidivas. Os sintomas sistêmicos da doença podem permanecer presentes durante semanas ou meses e a letalidade em pacientes não tratados é de 2%. O óbito se dá geralmente por endocardites e meningites, porém alguns pacientes se recuperam sem tratamento (BOSSI, *et al* 2004).

TRATAMENTO ANIMAL

O tratamento da Brucelose em animais não é recomendado, por ser oneroso e prolongado, tornando-se impraticável nas espécies animais (BRASIL, 2006). O impedimento do tratamento da Brucelose animal se baseia na característica intracelular da bactéria (PAPAS *et al*, 2006)

Nos animais de pequeno porte é indicada a eutanásia dos animais soropositivos. (MIRANDA, 2005). Os cães infectados devem ser removidos dos canis, não mais utilizados em reprodução e castrados (WANKE, 2004). O tratamento em cães é utilizado em alguns casos, porém o tratamento é longo, oneroso e sujeito a recidiva da doença, por este motivo não é indicado (OIE, 2007).

Nos eqüinos que são animais de estimação, não se recomenda o tratamento da doença, estes animais devem ser retirados da reprodução e devem ser encaminhados ao abate sanitário, por estarem geralmente em contato direto com o homem, são importantes fontes de infecção para humanos (RIBEIRO *et al*, 2008)

Nos grandes animais também é indicada a eutanásia nos soropositivos, especialmente para o controle da Brucelose bovina. O PNCEBT, em vigor a partir do ano de 2003, atua na erradicação da doença, e a efetivação do programa culmina com Abate Sanitário dos soropositivos, e Notificação Obrigatória destes casos encontrados na sorologia dos animais testados (BRASIL, 2006).

VACINAÇÃO

Atualmente não existe vacina disponível contra Brucelose que proteja os humanos. Porém existem vacinas eficientes na proteção animal, principalmente para bovinos (SELEEM, 2010).

No ano de 1930 foi utilizado com sucesso por um pesquisador chamado Buck, uma vacina originada de um isolado virulento, do leite de vaca Jersey. Esta cultura foi mantida à temperatura ambiente por mais de um ano, e quando testada em cobaias tinha perdido sua virulência. Como a cepa provinha da 19^o passagem da cultura isolada por Buck, recebeu esta identificação de B19. As características mais marcantes da cepa B19, são imunogenicidade e antigenicidade relativamente altas, baixa patogenicidade estável, atenuação da cepa e características biológicas comprovadamente estáveis, sendo introduzida para o uso à campo em 1941, até os dias atuais (NICOLLETI, 1990).

A produção da vacina B19 se dá a partir de células vivas atenuadas, conforme normas internacionais. Esta vacina é amplamente utilizada em todo o mundo e deve ser aplicada na porção subcutânea da pele dos animais jovens (SCHURIG, 2002).

A vacina mais utilizada contra Brucelose mundialmente é derivada da Cepa B19, cujos anticorpos formados e persistentes são dependentes da idade de vacinação das fêmeas jovens. Para que os títulos elevados de anticorpos não interfiram no diagnóstico posterior, com intuito de aferir a presença da doença nos rebanhos, um regulamento rígido na idade de vacinação, é fundamental no controle e diagnóstico da enfermidade (MORGAN, 1969; BRASIL 2006).

A vacinação contra Brucelose só pode ser realizada por veterinário cadastrado no Serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal do estado de atuação do profissional ou por vacinadores sob responsabilidade desse profissional. Todas as fêmeas bovinas e bubalinas na faixa de três a oito meses de idade devem ser obrigatoriamente vacinadas com a vacina obtida da Cepa B19 aplicada em todo

rebanho nacional, conforme o PNCEBT, que atua na erradicação da doença (BRASIL, 2006).

Os machos e fêmeas gestantes não devem ser vacinados com a Cepa B19, pois sendo uma vacina viva atenuada, pode causar orquite nos machos e aborto nas gestantes. Os homens podem se infectar e adquirirem a doença acidentalmente, por este motivo, a proteção individual do vacinador é fundamental, e o descarte correto dos frascos e seringas de suma importância na prevenção da doença (BRASIL, 2006)

A persistência de anticorpos séricos seguido da vacinação com a cepa B19 interferiu com programas de erradicação e estimulou a busca por vacinas que evitassem este problema. Logicamente, a utilização de uma estirpe viva atenuada e rugosa poderia evitar este problema, se a estirpe fosse estável e capaz de conferir imunidade sólida e protetora. *B. abortus* lisa cepa 45/0 foi isolada a partir de uma vaca em 1922 e um derivado bruto foi obtido após 20 passagens em cobaias. O derivado chamado cepa 45/20, foi capaz de proteger cobaias e bovinos da infecção por *Brucella* (McEWEN e PRIESTLEY, 1938; McEWEN, 1940). Infelizmente, quando usada como uma vacina viva, a estirpe 45/20 não era estável e tendia a reverter para a forma lisa, virulenta, derrubando o propósito de usar cepas rugosas, geralmente associadas a atenuação e incapacidade de induzir sorologia positiva (EDWARDS *et al*, 1945; TAYLOR e McDIARMID, 1949). A fim de superar a falta de estabilidade da estirpe vacina viva 45/20, ela foi utilizada como uma bacterina incorporada em adjuvantes, normalmente baseados em emulsões de água e óleo. Muito trabalho foi dedicado à utilização desta vacina com diferentes resultados em termos de eficácia protetora e indução de sorologia positiva. A proteção induzida por uma ou duas vacinações foi descrita como sendo superior, igual ou inferior a proteção induzida pela cepa B19 a maioria dos investigadores consideraram que duas vacinações eram necessárias (ROERINK, 1967; HALL *et al*, 1976;. MCKEON, 1976; CUNNINGHAM, 1970a,b; ALTON *et al*, 1983).

A inconveniência de anticorpos vacinais originados da vacina B19 no diagnóstico da Brucelose mostrou a necessidade de que fosse fabricada uma vacina sem interferência na sorologia para a doença. Os estudos foram direcionados na busca de uma mutante rugosa que não possuísse a cadeia O do polissacarídeo. A

RB51 foi a amostra resultante desta busca, sendo sua nomenclatura descrita como: o R relativo à rugosa, B originado de *Brucella* sp e 51 relativo à identificação laboratorial (SCHURIG *et al.*, 2002).

Estudos de segurança envolvendo a RB51 em bovinos revelaram que após a vacinação, não ocorre eliminação da bactéria no ambiente e esta não permanece no organismo dos vacinados por mais de 12 meses (ASHFORD *et al.*, 2004).

Até o ano de 1997, mais de 5.000.000 terneiras tinham sido vacinadas por via subcutânea (SC), com a dose recomendada de $1-3,4 \times 10^{10}$ organismos sem efeitos deletérios. Observações em relação à eficácia de proteção sugerem que a imunização deve começar com animais com mais de 4 meses. Vacas prenhas podem ser vacinadas com segurança via SC com 10^9 organismos de RB51, sem a indução de aborto ou placentite (PALMER *et al.*, 1997). Inoculação intravenosa de vacas prenhas com 10^{10} organismos pode levar a infecção da placenta e do feto, mas não provoca o aborto (PALMER *et al.*, 1996), sugerindo que a vacinação de não prenhas e bovinos adultos com uma dose completa deve ser segura, embora estudos controlados empregando a via SC recomendada e um maior número de bovinos sejam necessários para confirmar isto. A cepa RB51 foi aprovada para utilização como vacina oficial nos EUA, que substituiu a cepa B19, e seu uso também foi aprovado e implementado no México e Chile.

A vacina RB 51 está à disposição para a utilização em fêmeas bovinas e bubalinas adultas no Brasil, como vacina de caráter estratégico (BRASIL, 2006). Esta carrega a vantagem de não ser indutora de anticorpos aglutinantes, e não interferir no diagnóstico da doença. Possui ainda características de proteção semelhantes às da vacina B19, e por ser uma vacina viva, prevê os mesmos cuidados de manuseio (MONTANÃ, 1998).

A Vacina Rev. 1 é uma vacina atenuada derivada de uma cepa virulenta de *B. melitensis* que se tornou dependente de estreptomicina para o seu crescimento, mas perdeu essa característica, embora a resistência à estreptomicina tenha permanecido, após nova subcultura (ELBERG e FAUNCE 1957). Ela estimula a proteção contra a infecção por *B. melitensis* em ovinos e caprinos e também protege contra a infecção em carneiros por *B. ovis* (ELBERG e FAUNCE, 1957; ALTON *et al.*, 1967; ALTON, 1985; FENSTERBANK *et al.*, 1982). Esta vacina é atenuada, quando

comparada com as estirpes de campo, mas retém alguma virulência (ALTON *et al.*, 1967). Dependendo da dose administrada durante a prenhez, o aborto pode ocorrer com frequência variável (ALTON *et al.*, 1975,. BLASCO *et al.*, 1987; BARDENSTEIN *et al* , 2002), aparentemente a vacina não é virulenta (ERASMUS e BERGH, 1985) ou de baixa virulência (LANTIER e FENSTERBANK, 1985). Rev. 1 é um organismo liso, pelo que induz sorologia positiva, que interfere com o diagnóstico. (VAN DRIMMELEN e HORWELL De 1964).

PREVENÇÃO E CONTROLE

Educação em saúde é a base de toda e qualquer prevenção de doenças, e é no ensino básico que se começa a moldar os perfis de hábitos corretos de uma população. Para tanto os tempos modernos oferecem diversos meios, desde um simples folder colorido, até o acesso à globalização das redes sociais (ALMEIDA, 2006).

Quando ocorrem epidemias, algumas medidas devem ser tomadas. Descobrir as fontes de infecção e contaminação que podem ser de origem alimentar, ou por animais disseminadores, é a base para a correta eliminação do surto. Animais devem ser abatidos, alimentos incinerados, lembrando sempre que o uso de EPIs é a forma mais segura de proteção das equipes de trabalho à campo (MZCP/WHO, 1999).

Os animais são considerados portadores de *Brucella* ao longo da vida proporcionando uma grande fonte contínua de infecção humana. Uma diminuição na incidência de brucelose humana é susceptível de se conseguir, através do desenvolvimento de um programa de controle de brucelose animal. Reportagens sobre brucelose em humanos e animais têm sido consideradas essenciais (MZCP/WHO, 1999), de modo que a necessidade de um programa de controle da brucelose animal possa ser avaliado. A vacinação massiva na pecuária ou de animais jovens, juntamente com o abate de animais após o teste, voluntário ou obrigatório, pode ser aplicada dependendo da epidemiologia de cada zona e o progresso durante o curso do programa, como no programa de controle mais recente aplicado nos Açores (MARTINS *et al.*, 2009) e como no PNCEBT atualmente aplicado no Brasil (BRASIL, 2006).

O controle da Brucelose humana depende principalmente do controle da doença animal. A enfermidade pode ser adquirida, por exemplo, através de manipulação biológica não segura. Assim a educação dos profissionais de laboratório, na identificação correta do microorganismo, na adesão completa às precauções padrão, no uso de profilaxia antimicrobiana pertinente, na investigação

minuciosa de acidentes em laboratório, e no acompanhamento efetivo dos expostos, são as principais recomendações (YAGUPSKY & BARON, 2005).

A pasteurização do leite é imprescindível na proteção humana, e a fervura do leite deve ser usada na impossibilidade do beneficiamento do leite. O consumo de produtos animais crus ou mal cozidos deve ser evitado, assim como a prevenção deve ser observada em abates caseiros, contra inalação de aerossóis dispersos no ambiente, utilizando-se EPIs (OIE, 2008).

A brucelose em seres humanos, no Brasil, usualmente apresenta-se como zoonose ocupacional, acometendo tratadores de animais e magarefes, revelando associação com a manipulação de produtos de aborto ou vísceras de animais infectados. Contudo, o hábito da ingestão do leite cru ou de produtos lácteos fabricados com leite cru ainda existe e é provável que uma parcela de casos não esteja sendo diagnosticada (VASCONCELLOS & ITO 2011)

A utilização das vacinas contra Brucelose requer precisão nos cuidados com sua manipulação, pois sendo uma vacina viva atenuada, sua inoculação acidental em humanos pode originar patogenia nos indivíduos (BRASIL, 2006).

Determinadas práticas são eficazes para a prevenção da Brucelose, entre elas, não realizar a introdução de animais sem diagnóstico no rebanho, evitar o contato direto de animais de propriedades diferentes, impedir a inseminação artificial com sêmen desconhecido (VAN WAVERN, 1960; NICOLETTI, 1980)

O rastreamento sorológico dos animais de rebanho segundo as normas de erradicação nacional é fundamental na prevenção e controle da Brucelose, com indicação de Abate Sanitário e Notificação Compulsória (LAGE, *et al.*, 2008)

A retirada de placentas e restos fetais dos piquetes de maternidade, e a correta desinfecção de áreas contaminadas, previnem a possível contaminação dos demais animais da propriedade (CRAWFORD, HUBER & ADAM, 1990).

CONCLUSÃO

A Brucelose é uma das zoonoses mais importantes em saúde pública e animal, como descrito anteriormente. A sua erradicação nos homens e animais é dependente uma da outra, por este motivo o MAPA instituiu o PNCEBT na tentativa de erradicação animal e conseqüentemente humana. Para tanto o diagnóstico da doença deve sempre estar em aperfeiçoamento e prever uma eficácia futura cada vez mais apurada. A prevenção e controle são o caminho para a saúde humana e animal serem preservadas.

O gênero *Brucella* sobreviveu 107 anos, desde a descoberta do *micrococcus melitensis* no homem por David Bruce em 1887 até a descoberta da *B. canis* em caninos por Carmichael em 1968 nos Estados Unidos, com apenas seis espécies (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, e *B. canis*). A partir de 1994 até o ano de 2010, se passaram 16 anos e foram descobertas oficialmente mais quatro novas espécies (*Brucella ceti*, *Brucella pinipedialis*, *Brucella microti*, *Brucella inopinata*). Todas essas dez espécies com nomes válidos são altamente relacionadas umas com as outras, apresentando valores de similaridade de sequência de DNA de 98 % a 100 %.

Em uma publicação recente, Scholz & Vergnaud (2013), colocam o seguinte: **(1)** Uma nova cepa de *Brucella* incomum (BO2) foi isolada a partir de uma amostra de biópsia pulmonar de um paciente humano de 52 anos de idade, na Austrália, que teve pneumonia destrutiva crônica. Análises fenotípicas e moleculares colocaram a cepa BO2 na proximidade da *B. inopinata*. Assim, a estirpe BO2 provavelmente representa uma nova linhagem da *B. inopinata* (TILLER *et al.* 2010); **(2)** Sete cepas, isoladas em 1964 a partir de três espécies de roedores nativos no norte de Queensland, na Austrália, e reportadas anteriormente como *B. suis* biovar 3, foram de novo inquiridas para determinar a sua classificação exata. A análise molecular revelou que as sete estirpes são únicas e distintas de todas as espécies de *Brucella* conhecidas e, portanto, podem representar uma nova espécie. Os dados moleculares indicam também que as sete estirpes estão relacionadas com a cepa de

B. inopinata e BO2 (TILLER *et al.* 2010b); **(3)** Estirpes de *Brucella* atípicas foram recentemente isoladas pela primeira vez a partir de primatas não-humanos, em associação com dois casos de morte fetal. Análises fenotípicas e moleculares preliminares indicam que os dois isolados são diferentes de todas as espécies de *Brucella* conhecidas (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH *et al.* 2009). **(4)** Novas cepas atípicas de *Brucella* também foram isoladas de raposas vermelhas na Áustria (MAQUART *et al.* 2009). **(5)** Uma nova potencial espécie de *Brucella* foi isolada a partir de sapos africanos. Em contraste com outras espécies de *Brucella*, os isolados são móveis e equipados com um único flagelo lateralmente ligado, tal como foi descrito para o *O. anthropi*, cujo sequenciamento do genoma confirmou que pertence ao gênero *Brucella* (EISENBERG *et al.* 2012).

A partir destes dados, é óbvio que estamos apenas começando a entender o espectro ecológico completo do gênero *Brucella*. É também evidente que uma vasta gama de espécies animais são portadoras de uma série de novas, ainda não descritas, espécies de *Brucella* e organismos semelhantes à *Brucella*. No presente momento o potencial patogênico destas espécies novas de *Brucella* para os seres humanos ainda são desconhecidas e o ciclo natural de transmissão e manutenção não é compreendido. Apesar dos avanços recentes, os determinantes moleculares e os mecanismos de virulência da *Brucella* só estão apenas começando a ser compreendidos. *Brucella* spp. carece de fatores de virulência como os das bactérias clássicas e possuem mecanismos que impedem a ativação do sistema imune inato do hospedeiro. As bactérias são capazes de invadir diversos sistemas de órgãos diferentes e a infecção resultante tem uma gama de manifestações clínicas. Em bovinos, os mecanismos de abortos induzidos por *Brucella* são pouco compreendidos, mas placentite é a hipótese. Assim, a identificação e caracterização dos mecanismos que controlam a expressão de genes de invasão celular dentro do hospedeiro será fundamental para a compreensão do comportamento intracelular e projetar melhorias nas vacinas vivas atenuadas e novas ferramentas terapêuticas (POESTER *et al.* 2013)

BIBLIOGRAFIA

- ACKERMANN MR, CHEVILLE NF, DEYEOE BL. (1988) **Bovine ileal dome lymphoepithelial cell: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19.** *Vet Pathol* **25**: 28-35.
- ADAMS LG. (2002). **The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome.** *Vet.Microbiol.* **90**: 553–561.
- AI DAHOUK S, SCHOLZ HC, TOMASO H, BAHN P, GOLLNER C, KARGES W, APPEL B, HENSEL A, NEUBAUER H, NOCKLER K: (2010) **Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system.** *BMC Microbiol.*, **10**:269
- ALLEN CA, ADAMS LG, FICHT TA. (1998) Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* **66**: 1008-16.
- ALMEIDA GLG, D'ALMEIDA JM, HORN SC. (1988) **As doenças dos animais no Brasil: Histórico das primeiras observações.***Bol. Def. Sanit. Anim*, n.esp, 101p, 1988.
- ALTON GG, JONES LM, ANGUS RD & VERGER JM (1988). **Techniques for the Brucellosis Laboratory.** *Paris Institut National de la Recherche Agronomique*; 1988; 190 p.
- ANDERSON TD, MEADOR VP, CHEVILLE NF. (1986) **Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions.** *Vet Pathol* **23**: 219-226.
- ANGLE FE. (1935) **Treatment of acute and chronic brucellosis (undulant fever)personal observation of one hundred cases over a period of seven years** *The Journal of the American Medical Association*,**105**:939-942.
- ANTONIOLI C. and REVELEY M.A. (2005). **Randomised controlled trial of animal facilitated therapy with dolphins in the treatment of depression.** *BMJ* **331**: 1231.
- APARÍCIO ED. (2013) **Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*.** *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.* **32**: 53-60 .
- ARELLANO-REYNOSO B, LAPAQUE N, SALCEDO S, BRIONES G, CIOCCHINI AE, UGALDE R, MORENO E, MORIYÓN I. & GORVEL JP. (2005). – **Cyclic beta-1, 2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival.** *Nat. Immunol.*, **6** (6), 618–625.
- ARELLANO-REYNOSO B, LAPAQUE N, SALCEDO S, BRIONES G, CIOCCHINI AE, UGALDE R, MORENO E, MORIYÓN I, GORVEL JP. (2005). **Cyclic beta-**

- 1, 2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival.** *Nat Immun* **6**: 618-63.
- ARIZA J, BOSILKOVSKI M, CASCIO A, COLMENERO JD, CORBEL MJ, FALAGAS ME, MEMISH ZA, ROUSHAN MRH, RUBINSTEIN E, SIPSAS NV, SOLERA J, YOUNG EJ, PAPPAS G. (2007) **Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations** *PLoS Medicine* **4**: e317
- ASHFORD DA, Di PIETRA J, LINGAPPA JJ, WOODS C, NOLL H, NEVILLE B, WEYANT R, BRAGG SL, SPIEGEL RA, TAPPERO J. (2004) **Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51.** *Vaccine*; **22**: 3435-3439.
- ATLURI VL, XAVIER MN, de JONG MF, den HARTIGH AB, and TSOLIS RE (2011). **Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts.** *Annu.Rev. Microbiol.* **65**: 523–541.
- AUDIC S, LESCOT M, CLAVERIE JM and SCHOLZ H (2009). ***Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen.** *BMC Genomics.* **10**: 352-369.
- AZEVEDO SS, VASCONCELLOS SA, ALVES CJ, KEID LB, GRASSO LMPS, MASCOLLI R, PINHEIRO SR. (2003) **Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **4**: 156-160.
- BATCHELOR BI, BRINDLE RJ, GILKS GF, SELKON JB. (1992): **Biochemical mis-identification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory-acquired infections.** *The Journal of hospital infection*, **22**(2):159-162.
- BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL (1988). **As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações.** Brasília, 1988. 101P. Número especial.
- BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL (1998-2000), v.28-30, n.1-4.
- BOSCHIROLI ML, FOULONGNE V, O'CALLAGHAN D. (2001) **Brucellosis: a worldwide zoonosis.** *Current Opinion in Microbiology* **4**:58–64
- BOSCHIROLI ML, OUAHRANI-BETTACHE S, FOULONGNE V, MICHAUX-CHARACHON S, BOURG G, ALLARDET-SERVENT A, CAZEVIEILLE C, LIAUTARD JP, RAMUZ M, O'CALLAGHAN D. (2002). **The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 1544-9.
- BOSSI P, TEGNELL A, BAKA A, VAN LOOCK F, HENDRIKS J, WERNER A, MAIDHOF H, GOUVRAS G; (2004) **Task Force on Biological and Chemical Agent Threats, Public Health Directorate, European Commission, Luxembourg. Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-related brucellosis.** *Euro Surveill.* **9**(12): E15 - E16.
- BRASIL (1988). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária

- ÇELEBI G, KÜLAH C, KILIÇ SS, ÜSTÜNDAG G. (2007). **Asymptomatic Brucella bacteraemia and isolation of Brucella melitensis biovar 3 from human breast milk.** *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **39**: 205-208.
- CELLI J. (2006) **Surviving inside a macrophage: The many ways of Brucella** *Research in Microbiology* **157**: 93–98.
- CETÁCEOS, FAUNA e FLORA, 2013.<<http://naturaLink.sapo.pt/Natureza-e-Ambiente/Fauna-e-Flora/content/Cetaceos?viewall=true&print=true>>). Acessado em 12/10/13.
- CHACHRA D, SAXENA HM, KAUR G. and CHANDRA G. (2009) **Comparative efficacy of Rose Bengal plate test, standard tube agglutination test and Dot ELISA in immunological detection of antibodies to Brucella abortus in sera.** *Journal of Bacteriology Research.* **1**: 30-33.
- CHARISSIS N, VASSALOS CM. **Brucelose em agentes de guerra biológica.** *Ekdoseis Korontzis* : Atenas ; 2009
- CLOECKAERT A, VERGER JM, GRAYON M, PAQUET JY, GARIN-BASTUJI B, FOSTER G, and GODFROID J. (2001).**Classification of Brucella spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus.** *Microbes Infect.* **3**: 729–738.
- CORBEL MJ, World Organization for Animal Health (OIE). **Brucelose em Humanos e Animais.** WHO Library Publications. (World Organisation for Animal Health). 2006. 102p.
- CRAWFORD PR, HUBER JD. & ADAMS BS. (1990). **Epidemiology and surveillance.** In NIELSEN K & DUNCAM JR. (ed) *Animal Brucellosis.* CRC Press, Boca Raton, USA, 139-141.
- CRMV-RS (2003) Conselho Regional de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul INFORMATIVO “ON LINE” - nº 74 SEMANA de 12/10/03 a 18/10/03. A Associação dos Médicos Veterinários do Centro do Estado (ASMEVEC), **homenageou o primeiro brasileiro a ter o diploma de Médico Veterinário** na noite do dia 16 de outubro de 2003. <http://www.crmvrs.gov.br/Info074.htm>. acessado em 12/12/2013.
- CURATE F. **Antropologia Portuguesa.** ; Vol. 20,21. 209-235p. 2003/2004.
- CUTLER SJ. (2006) **Brucellosis – new paradigms for a classical pathogen.** *Culture.* **27**: 1-3.
- DAWSON CE, STUBBERFIELD EJ, PERRETT LL, KING AC, WHATMORE AM, BASHIRUDDIN JB, STACK JA, MACMILLAN AP. (2008) **Phenotypic and molecular characterisation of Brucella isolates from marine mammals.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:224 (1-8)
- de BAGUES MPJ, TERRAZA A, GROSS A, and DORNAND J. (2004). **Different responses of macrophages to smooth and rough Brucella spp.: relationship to virulence.** *Infect Immun* **72**: 2429-33.
- De BK, STAUFFER L, KOYLASS MS, SHARP SE, GEE JE, HELSEL LO, STEIGERWALT AG, VEGA R, CLARK TA, DANESHVAR MI, WILKINS PP. &

- WHATMORE AM. (2008). – **Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection.** *J. clin. Microbiol.*, **46**: 43–49.
- de TEJADA MG, PIZARRO-CERDÁ J, MORENO E, MORIYÓN I. (1995) **The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides.** *Infect Immun* **63**: 3054-61.
- DENNY HR. (1973). **A review of brucellosis in the horse.** *Equine Vet. J.* **5**: 121-125.
- DETILLEUX PG, DEYOE BL, CHEVILLE NF. (1990a). **Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in non phagocytic cells *in vitro*.** *Infect Immun* **58**: 2320-8.
- DETILLEUX PG, DEYOE BL, CHEVILLE, NF. (1990b) **Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy.** *Vet Pathol* **27**: 317-28.
- DOGANAY GD. and DOGANAY M. (2013) **Brucella as a Potential Agent of Bioterrorism** *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, **8**: 27-33
- EISENBERG T, HAMANN HP, KAIM U, SCHLEZ K, SEEGER H, SCHAUERTE N, MELZER F, TOMASO H, SCHOLZ HC, KOYLASS MS, WHATMORE AM. & ZSCHOCK M. (2012). – **Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs.** *Appl. environ. Microbiol.*, **78** (10), 3753–3755.
- EL-RAZIK AKA. (2007) **Monitoring of Brucella reactor does following milk examination using different techniques.** *Pakistan Journal of Biological Sciences.* **10**: 240-244.
- ELSAGHIR AA, JAMES EA. (2003): **Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by API 20NE.** *J Med Microbiol*, **52**:441-442.
- EWALT DR, PAYEUR JB, MARTIN BM, CUMMINS DR, MILLER WG. (1994). **Characteristics of a *Brucella* species from a bottle-nosed-dolphin (*Tursiops-truncatus*).** *J Vet Diagn Invest* **6**:448-452.
- FERNANDEZ-PRADA CM, NIKOLICH M, VEMULAPALLI R, SRIRANGANATHAN N, BOYLE SM, SCHURIG GG, HADFIELD TL, HOOVER DL. (2001). **Deletion of wboA enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*.** *Infect Immun* **69**: 4407-16.
- FERNANDEZ-PRADA CM, ZELAZOWSKA EB, NIKOLICH M, HADFIELD TL, ROOP RM 2nd, ROBERTSON GL, HOOVER DL. (2003). **Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis.** *Infect Immun* **71**:2110-9.
- FICAPAL A, JORDANA J, BLASCO JM, MORIYO I. (1998). **Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams** *Small Ruminant Research* **29**: 13–19
- FISCHER D, LORENZ N, HEUSER W, KÄMPFER P, SCHOLZ HC, LIERZ M. (2012) **Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*).** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* **43**: 625-628.

- FOSTER G, JAHANS KL, REID RJ, ROSS HM: (1996) **Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter.** *Vet Rec.*, **138**:583-586.
- FOSTER G, MacMILLAN AP, GODFROID J, HOWIED F, ROSSA HM, CLOECKAERT A, REIDA RJ, BREW S, PATTERSON IAP. (2002). **A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland;** *Veterinary Microbiology* **90**; 563–580.
- FOSTER G, OSTERMAN BS, GODFROID J, JACQUES I, CLOECKAERT A. (2007): ***Brucella ceti* sp. nov and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts.** *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:2688-2693.
- FRANCO MP, MULDER M, GILMAN RH, and SMITS HL. (2007). **Human brucellosis.** *Lancet Infect.Dis.* **7**: 775–786.
- GALL D, NIELSEN K, Bermudez MR, Moreno F, and Smith P, (2002) **Fluorescence Polarization Assay for detection of *Brucella abortus* antibodies in bulk tank bovine milk samples.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 1356-1360. DOI: 10.1128/CDLI.9.6.1356–1360.2002
- GAMAZO C. CONCEPCION ML, PRIOR S, VITAS AI, CAMPANERO MA, IRACHE JM, BLANCO-PRIETO MJ. (2006) **A Chemical and Biological factors in the control of *Brucella* and Brucelosis.** *Current Drug Delivery* **3**: 359-365.
- GARCIA-CARRÍLLO C. (1987) **La brucellosis de los animales en América y su relación com la infección humana.** Paris: Office International des Epizooties, 1987, 299p.
- GERRA H. (2007) **The *Brucellae* and Treir Success as Pathogens.** *Critical Reviews in Microbiology*; **33**:325–331.
- GLYNN MK, LYNN TV. (2008) **Brucellosis.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **233**: 900–908.
- GODFROID J, CLOECKAERT A, LIAUTARD JP, KOHLER S, FRETIN D, WALRAVENS K, GARIN-BASTUJI B, LETESSON JJ. (2005) **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.** *Vet Res.* **36**: 313 - 326.
- GODFROID J, NIELSEN K. and SAEGERMAN C, (2010) “Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife,” *Croatian Medical Journal*, **51**: 296-305. [doi:10.3325/cmj.2010.51.296](https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.296)
- GODFROID J, GARIN-BASTUJI B, SAEGERMAN C. & BLASCO JM. (2013). – **Brucellosis in terrestrial wildlife.** *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **32** (1), 27–42.
- GOMES MJP (2014). **Gênero *Brucella* spp.** *Microbiologia Clínica* 2006-2. <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Brucella%204-2013-1.pdf> Acessado em 10/01/2013.
- GORVEL JP. & MORENO E. (2002) ***Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication.** *Veterinary Microbiology* **90**: 281-297.
- GUERRA H. (2007). **The *Brucellae* and their success as pathogens.** *Crit Rev Microbiol* **33**: 325-331.

- GUZMÁN-VERRI C, GONZÁLEZ-BARRIENTOS R, HERNÁNDEZ-MORA G, MORALES JA, BAQUERO-CALVO E, OLARTE EC. and MORENO E. (2012) ***Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* www.frontiersin.org/cellular_and_infection_microbiology/archives/ February 2012 Volume 2 Article 3. Acessado em 10/01/2013.
- GUZMAN-VERRI C, MANTEROLA L, SOLA-LANDA A, PARRA A, CLOECKAERT A, GARIN J, GORVEL JP, MORIYON I, MORENO E, LOPEZ-GONI I. (2002). **The two component system BvrR–BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of the outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae.** *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12375-80.
- HALLING SM. & BOYLE SM. (2002) **Foreword Editorial;** *Veterinary Microbiology*; **90**: 1–3.
- HER M, Cho DH, KANG S-II, CHO YS, HWANG IY, BAE YC, YOON H, HEO YR, JUNG SC, YOO HS. (2010) **The development of a selective medium for the *Brucella abortus* strains and its comparison whit the currently recommended and used medium.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **67**: 15-21.
- HERNÁNDEZ-MORA G, GONZÁLEZ-BARRIENTOS R, MORALES JA, CHAVES-OLARTE E, GUZMÁN-VERRI C, BARQUERO-CALVO E, De-MIGUEL, MJ, MARÍN CM, BLASCO JM. and MORENO E. (2008).**Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica.** *Emerging Infect. Dis.* **14**, 1430–1433.
- HOYT E. and IÑÍGUEZ M (2008). *The State of Shale Watchingin Latin America*. Chippenham:WDCS.
- HUBBERT NL, BECH-NIELSEN S, BARTA O. (1980) **Canine brucellosis: comparison of clinical manifestations with serologic test results.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **177**: 168-171.
- JACQUES I, GRAYON M, VERGER JM. (2007) **Oxidative metabolic profiles of *Brucella* strains isolated from marine mammals: contribution to their species classification.** *FEMS Microbiol Lett.*, **270**:245-249.
- JAHANS KL, FOSTER G, BROUGHTON ES. (1997) **The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals.** *Vet Microbiol.*, **57**:373-382.
- JÚNIOR GN, RIBEIRO MG, MONTEIRO FM, JESUS TL, VIEIRA RM. (2012) **Brucelose em touros: Uma visão da doença no Brasil com ênfase ao diagnóstico e sua importância ao agronegócio.** *Tekhne e Logos*. São Paulo. **3**; n 3; 2012.
- KATO Y, MASUDA G, ITODA I, IMAMURA A, AJISAWA A. and, NEGISHI M. (2007) **Brucellosis in a Returned Traveler and His Wife: Probable Person-To-Person Transmission of *Brucella melitensis*.** *Journal of Travel Medicine*, **14**: 343–345.
- KAUFMANN AF, MELTZER MI. and SCHMID GP. (1997) **The Economic Impact of a Bioterrorist Attack: Are Prevention and Postattack Intervention Programs Justifiable?** *Emerging Infectious Disease* **3**: 83-94

- KEID LB, SOARES RM, MORAIS ZM, RICHTZENHAIN LJ, VASCONCELLOS AS.(2004) ***Brucella* spp. isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo State, Brazil.** *Brazilian Journal of Microbiology* (2004) 35:161-166
- KITTELBERGER R, HILBINK F, HANSEN M.F, ROSS GP, JOYCE M.A, FENWICK S, HEESEMANN J, WOLF-WATZ H, NIELSEN K, (1995) **Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9. II. The use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica* infections in ruminants.** *Vet. Microbiol.* 47: 271-280.
- KO J, SPLITTER GA. (2003). **Molecular host–pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans.** *Clinical Microbiology Reviews* 6: 65–78.
- KUDI AC, KALLA DJU, KUDI MC, KAPIO GI, (1997). **Brucellosis in camels** *Journal of Arid Environments*, 37: 413-417.
- KUPLULU O. (2004). **Isolation and identification of *Brucella* spp. in ice cream.** *Food Control.* 15; 511-514.
- KUSUMAWATI A, CAZEVIEILLE C, PORTE F, BETTACHE S, LIAUTARD JP & WIDADA JS. (2000). – **Early events and implications of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J774a.1 murine cell line and human monocytes.** *Microb. Pathogen*, 28 (6), 343–352.
- LAGE AP, POESTER FP, PAIXÃO TA, SILVA TMA, XAVIER MN, MINHARRO S, MIRANDA KL, ALVES CM, MOL JPS, SANTOS RL. (2008) **Brucelose bovina: uma atualização.** *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, 32: 202-212.
- LAPAQUE N, MORIYON I, MORENO E, GORVEL JP (2005). ***Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor.** *Curr Opin Microbiol* 8: 60-6.
- LAPAQUE N, MORIYON I, MORENO E, GORVEL JP. (2005). ***Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor.** *Curr Opin Microbiol* 8: 60-6.
- LAWINSK MLJ, OHARA PM, ELKHOURY MR, FARIA NC, CAVALCANTE, KRLJ. (2010) **Estado da arte da Brucelose em humanos.** *Revista Pan-Amaz Saúde.* 1: 75-84.
- LÓPEZ-GOÑI I, GUZMÁN-VERRI C, MANTEROLA L, SOLA-LANDA A, MORIYÓN I, MORENO E. (2002). **Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS.** *Vet Microbiol* 90: 329-39.
- LÓPEZ-GOÑI I, GUZMÁN-VERRI C, MANTEROLA L, SOLA-LANDA A, MORIYÓN I, MORENO E. (2002). **Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS.** *Vet Microbiol* 90: 329-39.
- LORD VR, LASERNA RH y MELÉNDEZ G. (1986) **SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN CABALLOS DE VENEZUELA,** *Veterinaria Tropical* 11: 31-42.
- LOUISIANA, 2008. www.infectiousdisease.dhh.louisiana.gov Acessado em 10/01/2013.

- MAGALHAES-NETO A, GIL-TURNES C. (1996) **Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira, 16: 75-79.**
- MALAKOFF D. (2001). **Marine mammals. Scientists uses strandings to bring species to life. Science 293: 1754–1757.**
- MANTUR BG, AMARNATH SK and SHINDE RS. (2007). **Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. Indian J. Med. Microbiol. 25: 188–202.**
- MANTUR BG, MANGALGI SS. and MULIMAN M. (1996) **“Brucella melitensis — a sexually transmissible agent?” Lancet, 347: 1763.**
- MAQUART M, ZYGMUNT MS, CLOECKAERT A, (2009). **Marine mammal Brucella isolates with different genomic characteristics display a differential response when infecting human macrophages in culture. Microbes Infect. 11:361-366.**
- MAQUART M, Le FLÈCHE P, FOSTER G, TRYLAND M, RAMISSE F, DJONNE B, AI DAHOUK S, JACQUES I, NEUBAUER H, WALRAVENS K, GODFROID J, CLOECKAERT A. & VERGNAUD G. (2009). – **MLVA-16 typing of 295 marine mammal Brucella isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within Brucella ceti and Brucella pinnipedialis. BMC Microbiol., 9, 145.**
- MARTINS H, GARIN-BASTUJI B, LIMA F, FLOR L, PINA FA, BOINAS F. (2009) **Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal: outcome of a 5-year programme (2002–2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. Prev Vet Med 90:80–89.**
- MARVULO MFV, FERREIRA F, DIAS RA, AMAKU M, GROFF ACM, GONÇALVES VSP, FIGUEIREDO VCF, LÔBO JR, FERREIRA NETO JS (2009). **Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 61:93-102.**
- MATEU-de-ANTONIO EM, MARTÍN M, CASAL J. (1994) **Comparison of serologic testes used in canine brucellosis diagnosis. J. Vet. Invest., 6: 257-259.**
- McCAUGHEY WJ, KERR WR. (1967). **Abortion due to Brucella in thoroughbred mare. Vet. Rec.. 80: 186-189.**
- McDONALD WL, JAMALUDIN R, MACKERETH G, HANSEN M, HUMPHREY S, SHORT P, TAYLOR T, SWINGLER J, DAWSON C.E, WHATMORE AM, STUBBERFIELD E, PERRETT LL, and SIMMONS G. (2006). **Characterization of a Brucella sp. strain as a marine- mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. J. Clin. Microbiol. 44: 4363–4370.**
- MEGID J, BRITO AF, MORAES CCG, FAVA, N, AGOTTANI J.(1999) **Epidemiological assessment of canine brucellosis. Arq. Bras. Med. Vet. Zoo., 51: 439-440.**
- MEGID J, RIBEIRO MG, JÚNIOR MG, CROCCI AJ. (2000). **Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno**

- acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina.** *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*; São Paulo; **37**: 395-399.
- MELO SMB, NASCIMENTO RM, AGUIAR PHP, FREIRE SMF. (1997) **Avaliação sorológica em gel de agarose para diagnóstico de *Brucella canis* em cães no distrito de Monte Gordo-Camaçari-Bahia.** *Arq. Esc. Med. Vet. UFB*, **19**: 119-127.
- MEYER KF. & SHAW EB. (1920). – **A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle.** *Studies on the genus *Brucella* nov. gen. J. infect. Dis.*, **27**, 173–184.
- MIRANDA KL, COTORELLO ACP, POESTER FP, LAGE AP.(2005) **Brucelose canina.** *Cad. Tec. Vet. Zootec* **47**: 66-82.
- MÓLNAR L, MÓLNAR E, CARVALHO M.(2001) **Capacidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico de brucelose canina.** *A Hora Veterinária*, **121**: 45-49.
- MORAES CCG, MEGID J, SOUZA LC, CROCCI AJ. (2002) **Prevalência da brucelose canina na microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, Brasil.** *Arq. Inst. Biol. S. Paulo*, **69**: 7-10.
- MORENO E, MORIYÓN I. In: DWORKING M, FALKOW S, ROSEMBERG E, SCHLEIFER KH, STACKEBRANDT E, Eds. **The Prokaryotes**, Springer: New York 2001 (Electronic version).
- MORGAN WJ. (1969) **Brucellosis in animals: diagnosis and control.** *Proc. R. Soc. Med.* **62**: 1050–1052.
- MZCP/WHO. (1999) **Report on the third workshop on human and animal brucellosis. Epidemiological surveillance in the MZCP (Mediterranean Zoonoses Control Programme) countries.** 1999, MZCP/Bruc/98:1–47.
- NARCISO J, SERRANO A, VENÂNCIO L, MORGADO A, PROENÇA R. (1991). **Brucelose: análise de uma casuística de 169 doentes.** *O Médico*, **125** (2040): 153-156.
- NASCIMENTO MGF, CUNHA CP, JESUS VLT, LIGNON GB, NASCIMENTO ER. (2002) **Levantamento de *Brucella abortus* em queijos Minas Frescal comercializados no estado do Rio de Janeiro.** *Rev. Hig. Alimentar* **16**: 63-66.
- NICOLETTI P. **Vaccination.** 283-299. In: Nielsen Klaus, Duncan JR **Animal brucellosis.** Boca Raton: CRC Press; 1990. 453p.
- NICOLETTI, P. (1980) **The epidemiology of bovine brucellosis.** *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, **24**: 69-98.
- NICOLLETTI P. (2002). **A short history of Brucellosis.** *Veterinary Microbiology*, **90**: 5-9.
- NIELSEN K. & GALL D.(2001) **Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: A review;** *J. Immunoassay and Immunochemistry* **22**: 183-201.
- NIELSEN K. (1997) **Brucellosis: development and success using ELISAs for diagnosis.** In: Proceedings of the International Symposium on Diagnosis and

- Control of Livestock Diseases using Nuclear and Related Techniques, FAO/IAEA. Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America. April 14-18, Vienna, Austria. 1997. http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1055_prn.pdf. Acessado em 13/10/14.
- NIELSEN K., SMITH P, WIDDISON J, GALL D, KELLY L, KELLY W, NICOLLETTI P. (2004) **Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica*. O:9 and *Escherichia coli* O157:H7.** *Veterinary Microbiol* **100**: 25-30.
- NIELSEN K. (2002) **Diagnosis of brucellosis by serology;** *Vet Microbiol.* **90**: 447-459.
- NIELSEN K, DUNCAN JR (1990) **Animal brucellosis.** Boca Raton: CRC Press; 1990. 453p.
- OCHOLI RA, KWAGAB JKP, AJOGIC I, BALE JOO. (2004). **Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria** *Veterinary Microbiology* **103**: 47–53
- OIE. Terrestrial Manual: **Bovine Brucellosis.** Chapter: 2.4.3; 624-659; 2008. Consult:(www.oie.int)
- OIE, Center for Food Security & Public Health. (2007) **Brucellosis.** Iowa State University. College of Veterinary Medicine. 2007. p.1-13.
- ORAMS MB. (1997). **Historical accounts of human-dolphin interaction and recent developments in wild dolphin based tourism in Australasia.** *Tourism Manag.* **18**, 317–326.
- PAIXÃO TA, ROUX CM, den HARTIGH AB, WALTERS SS, DANDEKAR S, SANTOS RL, and TSOLIS RM. (2009) **Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O-antigen.** *Infect Immun* **77**: 4197- 4208.
- PAPPAS G. and PAPADIMITRIOU P. (2007). **Challenges in *Brucella* bacteraemia.** *International Journal of Antimicrobial Agents.* **30S**: 29-31.
- PAPPAS G, AKRITIDIS N, BOSILKOVSKI M, and TSIANOS E. (2005). **Brucellosis.** *N.Engl.J.Med.* **352**: 2325–2336.
- PAPPAS G, PANAGOPOULOU P. CHRISTOU L, Akritidis N. (2006). ***Brucella* as a biological weapon.** *Cellular and Molecular Life Sciences;* **63**: 2229-2236.
- PAULIN LM. (2003). **Brucelose – artigo de revisão.** *Arq. Inst. Biol.,* **70**: 239-249.
- PAULIN LM, FERREIRA NETO JS. (2003) **O combate à brucelose bovina: Situação brasileira.** Jaboticabal: Funep, 2003. 154p.
- PAULSEN IT, SESHADRI R, NELSON KE, EISEN JA, HEIDELBERG JF, READ TD, DODSON RJ, UMayAM L, BRINKAC LM (2002). **The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts.** *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13148–13153.
- PERRIN W.F. (2009). World Cetacea Database. Disponível online em: <http://www.marinespecies.org/cetacea> . Acessado em: 12-10-2012.

- PINEDO, MC, ROSAS, FCW. MARMONTEL, M. (1992) **Cetáceos e pinípedes do Brasil: uma revisão dos registros e guia para identificação das espécies** UNEP/FUA, 1992 - 213 p.
- PIZARRO-CERDA J, MORENO, E, SANGUEDOLCE V, MEGE JL, and GORVEL JP. (1998). **Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed with in autophagosome-like compartments.** *Infect.Immun.* **66**: 2387–2392.
- POESTER FP, GONÇALVES VSP & LAGE AP (2002) **Brucellosis in Brazil.** *Vet. Microbiol.* **90**: 55-62.
- POESTER FP, NIELSEN K, SAMARTINO LE. and YU WL. (2010) **“Diagnosis of Brucellosis,”** *The Open Veterinary Science Journal*, **4**: 46-60
- POESTER FP, SAMARTINO LE, LAGE AP (2005); **Diagnóstico da brucelose bovina.** *Cad. Tec. Vet. Zootec;* **.47**: 13-29.
- PORTE F, NAROENI A, OUAHRANI-BETTACHE S and LIAUTARD JP, (2003). **Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome–lysosome fusion in murine macrophages.** *Infect Immun* **71**: 1481-90.
- POURBAGHER A, POURBAGHER MA, SAVAS L, *et al.* (2006) **Epidemiologic, clinical and imaging findings in brucellosis patients with osteoarticular involvement.** *AJR Am J Roentgenol* **187**: 873–880.
- RADOSTITS OM, GAY CC, BLOOD DC. and HINCHCLIFF KW, (2000). *Veterinary Medicine*, 9th Ed., ELBS Bailliere Tindall, London, UK, pp: 870-871.
- RASOOL O, FREER E, MORENO E, and JARSTRAND C.(1992). **Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils.** *Infect Immun* **60**: 1699-702.
- RIBEIRO MG, MOTTA RG, ALMEIDA CAS (2008); **Brucelose eqüina: aspectos da doença no Brasil;** *Vet Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte **2**: 83-92.
- RILEY LK, ROBERTSON DC. (1984). **Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes.** *Infect Immun* **46**: 224-30.
- RIO GRANDE DO SUL. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. *Programa de combate à brucelose.* 4.ed. Porto Alegre, 1961.
- ROY CR. (2005) **Trimming the fat: a *Brucella abortus* survival strategy.** *Nature Immunology.* **6**; 546-548.
- SAMARTINO LE & ENRIGHT FM (1993) **Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis.** *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **16** 95–101.
- SAMARTINO LE & ENRIGHT FM. (1996) ***Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation.** *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **19**: 55–63.
- SANTOS RL, MARTINS TM, BORGES ÁM, PAIXÃO TA. (2013) **Perdas econômicas devidas à brucelose bovina no Brasil** *Pesq. Vet. Bras.* **33**(6):759-764

- SCHOLZ HC & VERGNAUD G. (2013) **Molecular characterisation of *Brucella* species** *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **32**: 149-162
- SCHOLZ HC, NOCKLER K, GOLLNER C, BAHN P, VERGNAUD G, TOMASO H, AI DAHOUK S, KAMPFER P, CLOECKAERT A, MAQUART M, ZYGMUNT MS, WHATMORE AM, PFEFFER M, HUBER B, BUSSE HJ & De BK. (2010). – ***Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection.** *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, **60**: 801–808.
- SCHOLZ HC, AI DAHOUK S, TOMASO H, NEUBAUER H, WITTE A, SCHLOTER M, KAMPFER P, FALSEN E, PFEFFER M. & ENGEL M. (2008). – **Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the *Ochrobactrum-Brucella* group by *recA* and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis.** *Syst. Appl. Microbiol.*, **31** (1), 1–16.
- SCHOLZ HC, HOFER E, VERGNAUD G, Le FLECHE P, WHATMORE AM, AI DAHOUK S, PFEFFER M, KRUGER M, CLOECKAERT A. & TOMASO H. (2009). **Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in Lower Austria.** *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**: 153–156.
- SCHOLZ HC, HUBALEK Z, NESVADBOVA J, TOMASO H, VERGNAUD G, Le FLECHE P, WHATMORE AM, AI DAHOUK S, KRUGER M, LODRI C, and PFEFFER M. (2008c). **Isolation of *Brucella microti* from soil.** *Emerg Infect Dis* **14**: 1316–1317.
- SCHOLZ HC, HUBALEK Z, SEDLACEK I, VERGNAUD G, TOMASO H, AI DAHOUK S, MELZER F, KAMPFER P, NEUBAUER H, CLOECKAERT A, MAQUART M, ZYGMUNT MS, WHATMORE AM, FALSEN E, BAHN P, GOLLNER C, PFEFFER M, HUBER B, BUSSE HJ. & NOCKLER K. (2008a). – ***Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*.** *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, **58** (Pt 2), 375–382.
- SCHURIG GG, SRIRANGANATHAN N, CORBEL JM. (2002). **Brucellosis vaccines: past, present and future.** *Veterinary Microbiology*. **90**: 479–496.
- SEIMENIS A, MORELLI D, MANTOVANI A. (2006) **Zoonoses na região do Mediterrâneo.** *Ann Ist Super Sanita* **42**:437-445 .
- SELEEM MN, BOYLE, SM. and SRIRANGANATHAN N. (2010). **Brucellosis: are emerging zoonosis.** *Vet. Microbiol.* **140**: 392–398.
- SHOTRIDGE EH. (1967). **Two cases of suspected *Brucella abortus abortum* in mares.** *N. Z. Vet. J. (N.Z.)* **15**: 33-34.
- SILVA I, DANGOLLA A, KULACHELVY K. (2000). **Seroepidemiology of *Brucella abortus* infection in bovids in Sri Lanka.** *Preventive Veterinary Medicine*. **46**: 51-59.
- SKENDROS P, PAPPAS G, and BOURA P. (2011). **Cell-mediated immunity in human brucellosis.** *Microbes Infect.* **13**: 134–142.
- SMIRNOVA EA, VASIN AV, SANDYBAEV NT, KLOTCHENKO SA, PLOTNIKOVA MA, CHERVYAKOVA OV, SANSYZBAY AR, KISELEV OI. (2013) **Current Methods of Human and Animal Brucellosis Diagnostics.** *Advances in Infectious Diseases*, 2013, 3, 177-184.

- SOLA-LANDA A, PIZARRO-CERDÁ J, GRILLÓ MJ, MORENO E, MORIYÓN I, BLASCO JM, GORVEL JP, LÓPEZ-GOÑI I. (1998). **A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence.** *Mol Microbiol* **29**: 125-38.
- SRIRANGANATHAN, N. et al, (2009) **Genome mapping and genomics in animal-associated microbes.** In: *Brucella*, Springer (Chapter 1). 2009.
- STARK, CB, HENTGES, A, JORGE, S, RECUERO, ALC, BROD, CS, FERNANDES, CPH. (2008). Diagnóstico de leptospirose na espécie eqüina na zona sul do Rio Grande do Sul, Brasil. in 35^o Congr. Bras. Med. Vet., Gramado, RS, Brazil, 2008.
- STARR T, Ng TW, WEHRLY TD, KNODLER LA, CELLI J. (2008). ***Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment.** *Traffic* **9**: 678-94.
- STOENNER HG. & LACKMAN DB. (1957). – **A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas.** *Am. J. vet. Res.*, **18**: 947–951.
- SUTHERLAND SS. (1980). **Immunology of bovine brucellosis.** *Veterinary Bull*, **50**: 359-368.
- TIZARD IR. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**; Ed: Roca; 6^a Edição; São Paulo; 2002.
- TRINDADE PS, STARK KB, RECUERO ALC, JORGE S., FERNANDES CPH, BROD CS, SILVA CM. (2008) **Anticorpos anti *Brucella abortus* em humanos expostos a fator de risco ocupacional.** in 35^o Congr. Bras. Med. Vet., Gramado, RS, Brazil, 2008.
- TUMURKHUU G, KOIDE N, TAKAHASHI K, HASSAN F, ISLAM S, ITO H, MORI I, YOSHIDA T, YOKOCHI T. (2006). **Characterization of biological activities of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide.** *Microbiol Immunol* **50**: 421-7.
- VAN WAVERN GM. (1960). The control of brucellosis in the Netherlands. *Vet. Rec.*, **72**: 928.
- VASCONCELLOS SA; ITO FH. (2011) **Principais zoonoses transmitidas pelo leite – Atualização / Major milk transmitted zoonoses – Update / Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia** **9**: 32–37.
- VASSALOS CM, ECONOMOU V, VASSALOU E. and PAPADOPOULOU C. (2009). **Brucellosis in humans: why is it so elusive?** *Reviews in Medical Microbiology* **20**:63–73
- VERGER JM, GRIMONT F, GRIMONT PAD. & GRAYON M. (1985). – ***Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization.** *Int. J. syst. Bacteriol.*, **35**, 292–295.
- WANKE MM. (2004). **Canine brucellosis;** *Animal Reproduction Science*. 82–83; 195–207.
- WHATMORE AM, DAWSON CE, GROUSSAUD P, KOYLASS MS, KING AC, SHANKSTER SJ, SOHN AH, PROBERT WS, and McDONALD WL. (2008).

- Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection**
Emerging Infect. Dis. **14**: 517–518.
- WYATT HV. (2000). – **Sir Themistocles Zammit: his honours and an annotated bibliography of his medical work.** *Maltese Med. J.*, **12**, 27–30. Available at: sites.google.com/site/vivianwyatt/.
- WYATT HV. (2005). – **How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats.** *J. roy. Soc. Med.*, **98**, 451–454. Available at: sites.google.com/site/vivianwyatt/.
- WYATT HV. (2009). – **A tale of two goats and the fever transmitted by the milk of goats. PowerPoint presentation with notes.** Available at: sites.google.com/site/vivianwyatt/.
- WYATT HV. (2009). – **Brucellosis and Maltese goats in the Mediterranean.** *J. Maltese History Online*, **1** (2), 4–18. Available at: www.maltesehistoryonline.com.
- WYATT HV. (2011). – **The curious affair of the identity of Fioravanti Sammut and Themistocles Zammit.** *J. Med. Biog.*, **19**, 128–131. Available at: sites.google.com/site/vivianwyatt/.
- WYATT HV. (2013). – **Lessons from the history of brucellosis.** *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **32**: 17-25
- XAVIER MN, COSTA EA, PAIXÃO TA, SANTOS RL. (2009). **The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis.** *Ciência Rural*, Santa Maria, **39**: 2252-2260.
- YAGUPSKY P. (1999). “**Detection of Brucellae in Blood Cultures,**” *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 3437-3442.
- YAGUPSKY P. & BARON EJ. (2005). **Laboratory Exposures to Brucellae and Implications for Bioterrorism.** *Emerging Infectious Diseases*. **11**: 1180-5.
- YOUNG EJ. (2000). ***Brucella* species.** In **Principles and practice of infectious diseases.** 5th edition. Edited by: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Philadelphia: Churchill-Livingstone; 2000; 2386-93.
- YOUNG EJ. (1991). **Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature.** *Rev. Infect. Dis.* **13**:359–372.
- ZHAN Y, CHEERS C. (1995) **Differential activation of Brucella-reactive CD4+ cells by Brucella infection or immunization with antigenic extracts.** *Infect Immun.* **63**: 969-995.

4 CONCLUSÃO GERAL

A Brucelose é uma das zoonoses mais importantes em saúde pública e animal, como descrito anteriormente. A sua erradicação nos homens e animais é dependente uma da outra, por este motivo o MAPA instituiu o PNCEBT na tentativa de erradicação animal e conseqüentemente humana. Para tanto o diagnóstico da doença deve sempre estar em aperfeiçoamento e prever uma eficácia futura cada vez mais apurada. A prevenção e controle são o caminho para a saúde humana e animal serem preservadas.

O gênero *Brucella* sobreviveu 107 anos, desde a descoberta do *micrococcus melitensis* no homem por David Bruce em 1887 até a descoberta da *B. canis* em caninos por Carmichael em 1968 nos Estados Unidos, com apenas seis espécies (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, e *B. canis*). A partir de 1994 até o ano de 2010, se passaram 16 anos e foram descobertas oficialmente mais quatro novas espécies (*Brucella ceti*, *Brucella pinipedialis*, *Brucella microti*, *Brucella inopinata*). Todas essas dez espécies com nomes válidos são altamente relacionadas umas com as outras, apresentando valores de similaridade de sequência de DNA de 98 % a 100 %.

Em uma publicação recente, Scholz & Vergnaud (2013), colocam o seguinte: **(1)** Uma nova cepa de *Brucella* incomum (BO2) foi isolada a partir de uma amostra de biópsia pulmonar de um paciente humano de 52 anos de idade, na Austrália, que teve pneumonia destrutiva crônica. Análises fenotípicas e moleculares colocaram a cepa BO2 na proximidade de *B. inopinata*. Assim, a estirpe BO2 provavelmente representa uma nova linhagem de *B. inopinata* (TILLER *et al.* 2010); **(2)** Sete cepas, isoladas em 1964 a partir de três espécies de roedores nativos no norte de Queensland, na Austrália, e reportadas anteriormente como *B. suis* biovar 3, foram de novo inquiridas para determinar a sua classificação exata. A análise molecular revelou que as sete estirpes são únicas e distintas de todas as espécies de *Brucella* conhecidas e, portanto, podem representar uma nova espécie. Os dados moleculares indicam também que as sete estirpes estão relacionadas com a cepa de *B. inopinata* e BO2 (TILLER *et al.* 2010b); **(3)** Estirpes de *Brucella* atípicas foram recentemente isoladas pela primeira vez a partir de primatas não-humanos, em

associação com dois casos de morte fetal. Análises fenotípicas e moleculares preliminares indicam que os dois isolados são diferentes de todas as espécies de *Brucella* conhecidas (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH *et al.* 2009). **(4)** Novas cepas atípicas de *Brucella* também foram isoladas de raposas vermelhas na Áustria (MAQUART *et al.* 2009). **(5)** Uma nova potencial espécie de *Brucella* foi isolada a partir de sapos africanos. Em contraste com outras espécies de *Brucella*, os isolados são móveis e equipados com um único flagelo lateralmente ligado, tal como foi descrito para *O. anthropi*, cujo sequenciamento do genoma confirmou que pertence ao gênero *Brucella* (EISENBERG *et al.* 2012).

A partir destes dados, é óbvio que estamos apenas começando a entender o espectro ecológico completo do gênero *Brucella*. É também evidente que uma vasta gama de espécies animais são portadoras de uma série de novas, ainda não descritas, espécies de *Brucella* e organismos semelhantes à *Brucella*. No presente momento o potencial patogênico destas espécies novas de *Brucella* para os seres humanos ainda são desconhecidos e o ciclo natural de transmissão e manutenção não é compreendido. Apesar dos avanços recentes, os determinantes moleculares e os mecanismos de virulência da *Brucella* só estão apenas começando a ser compreendidos. *Brucella* spp. carece de fatores de virulência como os das bactérias clássicas e possuem mecanismos que impedem a ativação do sistema imune inato do hospedeiro. As bactérias são capazes de invadir diversos sistemas de órgãos diferentes e a infecção resultante tem uma gama de manifestações clínicas. Em bovinos, os mecanismos de abortos induzidos por *Brucella* são pouco compreendidos, mas placentite é a hipótese. Assim, a identificação e caracterização dos mecanismos que controlam a expressão de genes de invasão celular dentro do hospedeiro serão fundamentais para a compreensão do comportamento intracelular e projetar melhorias nas vacinas vivas atenuadas e novas ferramentas terapêuticas (POESTER *et al.* 2013).

Os testes sorológicos não podem diferenciar entre espécies de *Brucella* e não podem, portanto, identificar quais espécies induziram anticorpos; só o isolamento da *Brucella* sp., ou a detecção específica de DNA por PCR, permite a identificação da cepa infectante (GODFROID *et al.* 2013).

AAT é um teste de triagem que se refere a apresentar uma alta sensibilidade e especificidade apenas razoável, o que geralmente leva a reações falso-positivas.

Segundo DAVIES *et al.* (1971) o AAT apresenta 99.6% de sensibilidade e 83.1% de especificidade.

Dentro da margem de especificidade do teste, segundo PNCEBT poderiam ocorrer reações falso positivas decorrentes de dois fatores distintos. **Primeiro**, a reação pode ocorrer devido à presença de anticorpos inespecíficos presentes nas infecções por outras bactérias, como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O:157, ou *Pseudomonas* sp. **Segundo**, podem decorrer como resultado da vacinação com B19 após a idade recomendada.

O PNCEBT também cita a prevalência da brucelose bovina na região sul do Rio Grande do Sul, como de 3.11%. Nesta área foi desenvolvido o estudo: Brucelose bovina: avaliação de testes sorológicos após aplicação de levamisole, onde se encontrou uma prevalência geral de 1,41% dessas reações sorológicas falso positivas quando da análise de 989 bovinos sorologicamente negativos, provenientes de propriedades com e sem história de aborto por *brucella* spp. Portanto, um **Terceiro** fator distinto poderia ser acrescentado como decorrente de aplicação de levamisole até uma semana antes da sorologia para a doença, principalmente em animais imunodeprimidos, apresentando condição corporal ruim ou que a sorologia ocorresse na primavera, ocasião em que a prevalência de tal fator poderia chegar a 4,27%.

Levamisole como imunoestimulante e anti-helmíntico é amplamente utilizado com sucesso em medicina humana e animal, e permanece recomendado no presente estudo.

A aplicação de Levamisole em bovinos pode levar ao aparecimento de FPSR no diagnóstico de Brucelose.

Para a utilização segura do Levamisole evitando a perda de animais FPSR, frente ao diagnóstico da brucelose, recomenda-se um período de carência de no mínimo 15 dias entre a aplicação do medicamento e a realização do diagnóstico para brucelose bovina.

A aplicação de Levamisole na primavera e o concomitante diagnóstico de Brucelose, sem respeitar o período de carência de 15 dias, pode aumentar o número de FPSR em até 23,42 vezes.

A aplicação de Levamisole em animais com Condição Corporal Ruim e o concomitante diagnóstico de Brucelose, sem respeitar o período de carência de 15 dias, pode aumentar o número de FPSR em até 9,74 vezes.

ANEXOS



Anexo I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE VETERINÁRIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ declaro que concordo em participar como colaborador no fornecimento de animais, sob a condição de empréstimo para a pesquisa prevista no projeto “BRUCELOSE BOVINA: Reações sorológicas falso-positivas (FPSR) após aplicação de Levamisole”. Afirmo que fui informado (a) de maneira clara e detalhada sobre os objetivos e metodologia da pesquisa proposta e esclareci minhas dúvidas, estando ciente que a qualquer momento, poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão sobre esta colaboração, se assim o desejar. Neste termo, fica acordado que: todos os dados desta pesquisa serão tornados de meu conhecimento; minha participação não acarretará em custos além do fornecimento de animais na condição supracitada, e que não receberei nenhuma compensação financeira em caso de haver óbito, invalidez temporária ou permanente do(s) animal(ais) em estudo, seja por parte do pesquisador responsável, do grupo de pesquisa a que pertence ou da própria Universidade Federal de Pelotas. Também fica acertado que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Sempre que necessário poderei chamar a pesquisadora Ana Lúcia Coelho Recuero ou o coordenador Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles nos telefones (53) 8133 9627 e (53) 3275.7599, para dirimir minhas dúvidas. Assim sendo, declaro que concordo em participar desse estudo permitindo que meus animais sejam utilizados nesta pesquisa, conforme quantidade e características descritas a seguir:

Espécie: Bovina

Raça:

Idade: Fêmeas vacinadas com mais de 24 meses.

Quantidade:

Local:

Data:

Nome:

Assinatura do Participante _____

Nome: Ana Lúcia Coelho Recuero

Assinatura do Pesquisador _____

Nome: Mário Carlos Araújo Meireles

Assinatura do Coordenador _____

Anexo II

Questionário N^o: _____ Data Zero ____/____/____ Data 7 ____/____/____ Data 14 ____/____/____ Data 21 ____/____/____

Propriedade: _____ N^o de Bovinos da propriedade _____ N^o de Hectares para pecuária _____

Pecuária: Corte () Leite () **Com histórico de Aborto () Sem histórico de Aborto ()** Concentração de Levamisole: 7,5% (), 18,8% ()

Condição Corporal (CC) média dos animais da propriedade: Um (), Dois (), Tres (), Quatro (), Cinco () **Estação do Ano:** () Primavera, Verão (), Outono (), Inverno ()

Dia Zero

N ^o	N ^o Animal	Raça	Idade	AAT	2ME	FPA	N ^o	N ^o Animal	Raça	Idade	AAT	2ME	FPA
01							26						
02							27						
03							28						
04							29						
05							30						
06							31						
07							32						
08							33						
09							34						
10							35						
11							36						
12							37						
13							38						
14							39						
15							40						
16							41						
17							42						
18							43						
19							44						
20							45						
21							46						
22							47						
23							48						
24							49						
25							50						