

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PESQUISA DE *Brucella* spp. EM LINFONODOS DE SUÍNOS E
JAVALIS COM LINFADENITE**

ACÁCIA FERREIRA VICENTE

BOTUCATU – SP

Junho/2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PESQUISA DE *Brucella* spp. EM LINFONODOS DE SUÍNOS E
JAVALIS COM LINFADENITE**

ACÁCIA FERREIRA VICENTE

Dissertação apresentada junto ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Saúde Animal, Saúde Pública e Segurança Alimentar para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^ª. Titular Jane Megid

BOTUCATU – SP

Junho/2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Vicente, Acácia Ferreira.

Pesquisa de *Brucella* spp. em linfonodos de suínos e javalis com
linfadenite / Acácia Ferreira Vicente. – Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Jane Megid

Capes: 50502034

1. Brucelose em suíno – Epidemiologia. 2. Linfadenite. 3. Suíno –
Doenças. 4. Zoonoses. 5. Doenças transmissíveis em animais.

Palavras-chave: Brucelose suína; Epidemiologia; Javalis; Linfadenite; Suínos.

Nome da Autora: Acácia Ferreira Vicente

Título: PESQUISA DE *Brucella* spp. EM LINFONODOS DE SUÍNOS E JAVALIS COM LINFADENITE.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Titular Jane Megid

Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Prof^a. Dra. Adriana Cortez

Membro

Faculdade de Medicina Veterinária – Campus I UNISA – São Paulo

Prof. Titular Julio Cesar de Freitas

Membro

Departamento de Higiene Veterinária Preventiva

Centro de Ciências Agrárias - UEL - Londrina

Data da Defesa: 26 de junho de 2013.

EPÍGRAFE

“O fracasso é a oportunidade de começar de novo
com mais inteligência e redobrada vontade.”

Henry Ford

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e a minha família que me incentivam a todo o momento seguir meus sonhos, não importando as dificuldades da vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dr^a Jane Megid, pela orientação, pela confiança na condução deste trabalho e pelo constante encorajamento.

À minha amiga, Susan, pela companhia dentro e fora do laboratório. Obrigada, amiga, por alegrar as horas tediosas com a sua companhia.

Aos amigos de laboratório, Marina, João Marcelo e Camila, pela colaboração e me proporcionarem momentos felizes.

Aos bolsistas de treinamento técnico, Bruna e Mateus, por toda a ajuda na realização prática do trabalho. O suor de vocês foi indispensável para que os prazos fossem cumpridos.

Aos técnicos dos laboratórios de Biologia Molecular e Microbiologia do DHVSP – FMVZ, Clóvis Reynaldo Fonseca e Fernando Paganini, pelo auxílio e dedicação nas atividades desenvolvidas no laboratório.

À Prof. Dr^a Adriana Cortez, pelas sugestões valiosas na execução e na finalização da redação do projeto.

Ao Residente da MI, Moisés, pela ajuda na realização das lâminas de Gram.

À técnica do Laboratório de Microbiologia de Inspeção de Alimentos, Gilda Pinto do Amaral, pela simpatia e colaboração.

À CAPES pela bolsa concedida durante a realização desse estudo.

À FAPESP pelo auxílio concedido que viabilizou a realização deste projeto de pesquisa (Processo 2010/07874-8).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos sorológicos da infecção de *Brucella* spp. em 29 suídeos realizados no Brasil (1991-2012).

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico	8
Resumo	11
Abstract	11
CAPÍTULO 3 – Trabalho Científico	26
Resumo	30
Abstract	30
CAPÍTULO 4	34
DISCUSSÃO GERAL	34
CONCLUSÕES GERAIS	35
BIBLIOGRAFIA	36

VICENTE, A. F. **Pesquisa de *Brucella* spp. em linfonodos de suínos e javalis com linfadenite.** Botucatu, 2013, 39p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A carne suína é a fonte de proteína de origem animal mais consumida no mundo, tendo o Brasil como o quarto maior produtor e exportador. A brucelose é uma das mais importantes e amplamente distribuídas zoonoses mundial. A prevenção da brucelose humana depende do controle da doença nos animais. O diagnóstico definitivo é o isolamento da bactéria, porém técnicas de biologia molecular permitem a detecção do agente e diferenciação em espécies e biótipos reduzindo o tempo necessário para o diagnóstico final. Os programas de controle e erradicação utilizam os testes sorológicos para o diagnóstico da doença existindo, no entanto, variação quanto ao tipo de teste utilizado de acordo com diferentes países e pesquisadores. No Brasil relatos de soropositividade para brucelose em suínos variam de zero a 100% de acordo com a região, amostragem e metodologia utilizada, porém estudos da enfermidade em suídeos com lesões de linfadenite não são encontrados. Este trabalho pretende descrever a situação epidemiológica da brucelose em suínos no Brasil, avaliar os meios de cultura ágar *Brucella*, CITA e Farrell para isolamento desta bactéria e detectar a presença do agente em linfonodos de suínos e javalis, com linfadenite, abatidos em frigoríficos no estado de São Paulo, e destinados ao consumo humano.

Palavras-chave: brucelose suína, epidemiologia, javalis, linfadenite, suínos.

VICENTE, A. F. **Research of *Brucella* spp. in lymphonodes of swine and wild boars with lymphadenitis.** Botucatu, 2013, 39p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2013.

ABSTRACT

Pork is the most consumed source of animal protein in worldwide. Brucellosis is one of the most important and worldwide distributed zoonosis. The prevention of human brucellosis depends on controlling the disease in animals. The bacteria isolation is the standard technique but new molecular methods allow the detection and differentiation the agent in species and biotypes reducing the time required for the final diagnosis. The control and eradication programs are based in serological tests for the diagnosis, however, variation in these tests according to different countries and researchers are common. In Brazil reports for seropositivity in swine range from zero to 100% depending on region, sampling and methodology, but studies of the disease in suidae with lymphadenitis are not found. This study aims to describe the epidemiological situation of brucellosis in pigs in Brazil and evaluate *Brucella* agar, CITA and Farrell culture media for isolation of the bacteria and to detect the presence of the agent in lymph nodes of pigs and boars with lymphadenitis slaughtered in the state of São Paulo and sent for human consumption.

Key words: swine brucellosis, epidemiology, wild boars, lymphadenitis, swine.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é a fonte de proteína de origem animal mais consumida no mundo. No Brasil, em decorrência de diferenças de poder aquisitivo, hábitos e costumes da população, a carne mais consumida é a de frango, seguida pela bovina e suína (ABIPECS, 2013).

Em 1996 e 1997 foram introduzidos no Brasil javalis originários dos Estados Unidos e Canadá (DEBERDT & SCHERER, 2007), no entanto, são escassas, em nosso país, as informações sobre a susceptibilidade dos javalis às enfermidades comuns aos suínos. Javalis são reservatórios de diversas doenças que acometem animais domésticos e de humanos. Para os animais domésticos atua como reservatório da peste suína clássica, brucelose e triquinelose, e para seres humanos da hepatite E, tuberculose, brucelose, leptospirose e triquinelose (MENG et al., 2009). Os animais domésticos e selvagens, por sua vez, atuam como fonte de infecção para os humanos (ACHA & SZYFRES, 2003).

A linfadenite em suínos é uma das principais afecções de suínos no Brasil e acarreta alto prejuízo econômico condenação de vísceras e carcaças com destino condicionado (AMARAL et al., 2004).

No Brasil pouca ênfase tem sido dada a investigação etiológica dos microorganismos envolvidos na linfadenite de suínos. Entretanto, Oliveira et al. (1995) avaliaram a etiologia bacteriana de linfonodos que apresentavam linfadenite do estado do Rio Grande do Sul isolando *Mycobacterium* sp. e *Rhodococcus equi*. Já no estado de São Paulo são descritos em linfonodos de suínos com lesões linhagens de *Mycobacterium* spp, *Rhodococcus equi*, *Streptococcus* β hemolítico, *Corynebacterium* spp. e *Arcanobacterium pyogenes* (LARA, 2009). Amaral et al. (2004) relatam fatores de risco na fase de crescimento-terminação, como o manejo dos animais, higiene das instalações, tratamento da água, produção e estocagem da ração, que melhor explicam a ocorrência de linfadenites em criações de suídeos.

Considerando a necessidade de estudos na epidemiologia da brucelose suína, o presente estudo objetivou detectar a presença e determinar o perfil das espécies que acometem os suídeos destinados a consumo no centro-oeste paulista.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A carne suína é a fonte de proteína mais consumida no mundo, sendo o Brasil o quarto maior produtor e exportador. Neste contexto a suinocultura brasileira desempenha um importante papel no agronegócio do país. Esta cadeia produtiva é um importante fator de desenvolvimento econômico nacional, pois provoca efeitos multiplicadores de renda e emprego em diferentes setores da economia exigindo do sistema de vigilância sanitária padrões rígidos de controle de doenças, principalmente das zoonoses (ABIPECS, 2013).

Brucelose é uma enfermidade infecciosa debilitante em humanos considerada uma das cinco zoonoses mais comuns em todo o mundo, responsável por infecção crônica em animais. É causada por bactérias do gênero *Brucella*, Gram-negativas, intracelulares facultativas, não capsuladas, imóveis e não formadoras de esporos (KO & SPLITTER, 2003).

Segundo o Subcomitê de Taxonomia da *Brucella* (2013) o gênero é constituído por seis espécies consideradas clássicas: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis* e *Brucella neotomae*, as espécies marinhas *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, e também *B. microti* e *B. inopinata*.

Brucella suis é dividida em cinco biovars sendo o 1, 2 e 3 encontrados em suínos e javalis. Os mais patogênicos para humanos são os biovars 1 e 3 (DI FEBBO et al., 2012). No Brasil, até o momento, foi isolado somente o biovar 1 (MATHIAS, 2008).

Suínos de qualquer idade podem contrair a enfermidade. A transmissão de animal para animal ocorre através da ingestão de água e alimentos contaminados com descargas vulvares, membranas fetais de matrizes infectadas ou fetos abortados. Os cachaços transmitem a bactéria pelo sêmen (SILVA et al., 2009, JESUS et al., 2010).

Quando atravessa as mucosas do trato respiratório, digestivo ou genitário, a bactéria sofre fagocitose e alcança os linfonodos regionais, levando a posterior disseminação sistêmica. Nos suínos ocorre bacteremia intermitente (ROSA et al., 2012). Possui maior tropismo por macrófagos, células dendríticas e trofoblastos (XAVIER et al., 2010; BARGEN et al., 2012). A capacidade da *Brucella* de sobreviver e se multiplicar dentro das células são fatores

responsáveis pela cronicidade da infecção (KO & SPLITTER, 2003; BARGEN et al., 2012).

Os sinais clínicos nos suínos podem variar de acordo com a idade do animal, o tempo de exposição e o órgão acometido (MEGID et al., 2010). A brucelose suína causa aborto em fêmeas, em qualquer estágio da gestação, sendo influenciada pelo tempo de exposição ao agente. Nos cachos predomina a orquite podendo ocorrer necrose testicular e epididimite (JESUS et al., 2010). Em ambos os sexos pode ocorrer abscessos de diferentes tamanhos acometendo órgãos e tecidos (MEGID et al., 2010).

As taxas de incidência de brucelose humana foram menores em países que adotaram programas de combate à brucelose animal demonstrando ser esse o caminho para evitar a infecção (ROSA et al., 2012). Mesmo não sendo tão disseminada na população humana, pode dar origem a quadros clínicos graves com sérias complicações para as pessoas acometidas (MATHIAS, 2008). Nos humanos a enfermidade se manifesta por febre contínua, intermitente ou irregular, podendo chegar até os 40°C. Ocorre também insônia, impotência sexual, anorexia e letargia (SELEEM et al., 2009). Se não tratada pode ocorrer complicações severas como endocardite, meningoencafalite, artrite, espondilite, orquite e distúrbios psicológicos (WHATMORE, 2009). Para o tratamento utiliza-se uma associação de antibióticos sendo a doxiciclina e estreptomicina as drogas de eleição (BARGEN et al., 2012).

O homem se infecta por inalação, ingestão ou penetração da bactéria por mucosas ou pele com solução de continuidade. A infecção por *B. suis* no homem ocorre mais frequentemente em pessoas que manuseiam porcos em suinoculturas ou em abatedouros. Em função da constante bacteremia, o consumo da carne suína mal passada ou crua representa um risco elevado para humanos (ROSA et al., 2012). Além disso, o abate clandestino de suínos, uma prática que ainda ocorre no país, representa um elevado risco sanitário para as pessoas envolvidas no abate, para os consumidores e para a população de uma forma geral. Este risco está associado a ingestão de alimento de qualidade sanitária suspeita e contaminação do meio ambiente, à exposição do agente em contato com os humanos, já que os equipamentos de proteção individual são precários e na maioria dos casos até ausentes (FREITAS et al., 2001).

Apesar de divulgações a respeito do risco decorrente do consumo de alimentos crus ou não adequadamente tratados com calor, do contato de animais sem a observação de medidas de precaução, do manuseio e da manipulação de órgãos, produtos, subprodutos e excreções de animais sem o uso de equipamentos de proteção, a brucelose continua sendo um importante problema de saúde pública (FREITAS et al., 2001).

É necessário que haja uma intensificação no trabalho comunitário de esclarecimento para o proprietário, trabalhadores e magarefes, bem como para lideranças de comunidades, agentes de saúde animal e consumidores (RIBEIRO et al., 2001; AZEVEDO et al., 2012).

Como não há vacinas contra *B. suis*, o controle é feito por medidas que reduzem o risco de infecção. De acordo com a normativa 19 de 15 de fevereiro de 2002, toda granja certificada (GRSC) deverá ser livre de brucelose, sendo esta enfermidade de notificação obrigatória. Os animais (reprodutores machos e fêmeas) deverão ser submetidos a provas sorológicas, com intervalo de seis meses, utilizando o antígeno acidificado tamponado ou outro aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e indicado para o caso, devendo os soros reagentes serem submetidos a provas complementares do 2-mercaptoetanol ou fixação de complemento (BRASIL, 2002).

O diagnóstico definitivo é o isolamento da *B. suis* de animais infectados (DI FEBO et al., 2012; PRAUD et al., 2012).

A maioria das espécies de *Brucella* podem ser isoladas em um meio de cultura basal, mas o uso de um meio de cultura não seletivo não é recomendado para o isolamento primário de *Brucella* pelo crescimento de grande número de contaminantes que podem estar presentes em amostras de campo colhidas por veterinários e outros profissionais (MARÍN et al., 1996). O crescimento de fungos como também de bactérias comensais e do ambiente de coleta, frequente em contaminação das placas, levam a redução da sensibilidade do diagnóstico bacteriológico (DE MIGUEL et al., 2011).

Kuzdas e Morse (1953) foram os primeiros a introduzir o conceito de meio seletivo para o isolamento de *Brucella*. Ao longo dos anos foram publicadas vários meios seletivos contendo antibióticos e/ou corantes bacteriostáticos, em combinação com diferentes tipos de meio de cultura como Morris (1956), Jones e Morgan (1958), Brown et al. (1971), Farrell (1974) e muitos outros grupos de

pesquisadores. Estas pesquisas tiveram o objetivo de desenvolver um meio de cultura adequado para o isolamento de *Brucella*, o qual permitia o crescimento destas e inibia o crescimento de outros microorganismos que poderiam estar presentes nas amostras analisadas. Logo, o uso de meios contendo antibióticos para o isolamento seletivo de *Brucella* de materiais contaminados foi um avanço no diagnóstico da brucelose e é de extrema importância para um diagnóstico bacteriológico adequado (DE MIGUEL et al., 2011).

Segundo a OIE (2009), o uso simultâneo do meio seletivo contendo Farrell e o meio Thayer-Martin modificado é considerado, atualmente, a estratégia de escolha para o isolamento primário de *Brucella* de amostras de campo.

Em animais infectados vivos, a brucela pode ser isolada de descargas vaginais, placenta, feto, leite e sêmen. Após a necropsia pode-se isolar de linfonodos, fígado, baço, glândula mamária, epidídimo e próstata (DE MIGUEL et al., 2011).

O isolamento e tipificação das espécies de *Brucella* em biovares é o método de diagnóstico padrão-ouro, e que até o presente momento não foi substituído por nenhuma outra técnica de diagnóstico. Porém, a bacteriologia da *Brucella* é complexa, por ser um processo lento, caro, impraticável para ser realizado em nível individual em uma grande população, além de ser um risco para as pessoas que manuseiam a bactéria viva (DI FEBBO et al., 2012; MUÑOZ et al., 2012; PRAUD et al., 2012).

O diagnóstico pode ser baseado na observação dos sinais clínicos associados com sorologia positiva (PRAUD et al., 2012). Porém, os testes sorológicos para brucelose em suínos têm como base os mesmos testes utilizados para diagnóstico de brucelose em bovinos (JESUS et al., 2010). No entanto, nenhum desses testes mencionados são completamente satisfatórios para diagnóstico individual de porcos e capazes de detectar reação cruzada com outras bactérias Gram negativas, especialmente *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:9 (DI FEBBO et al., 2012; MUÑOZ et al., 2012). Além disto, o soro suíno pode às vezes conter anticorpos não específicos, provavelmente IgM, que reduz a especificidade destes testes convencionais, especialmente no que se refere a testes de aglutinação (DI FEBBO et al., 2012).

Considerando a necessidade de estudos na epidemiologia da brucelose suína e as dificuldades do diagnóstico bacteriológico, o presente estudo

objetivou comparar três meios de cultura utilizados para isolamento da *Brucella* spp e detectar a presença do agente em suídeos destinados a consumo no centro-oeste paulista.

CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico

Trabalho a ser enviado para a revista Ciência Animal Brasileira.

Normas para publicação da revista:

Os trabalhos podem ser redigidos em português, inglês. Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um dos mesmos, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão, e não devem aparecer no arquivo. Ciência Animal Brasileira sugere que o número máximo de autores por artigo seja de 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial e, se necessário, solicitada a correção. O não atendimento de tal proposta pode implicar em recusa de sua publicação. Sugere-se um número máximo de 20 páginas e as figuras, gráficos e tabelas devem ser colocados no corpo do texto onde forem citados. É importante ressaltar que pesquisas feitas com animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da instituição onde foi realizada a pesquisa. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo. Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

Para submissões em português:

Título em português: Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;
Resumo: Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

Palavras-chave: idem, e no máximo 5 palavras chave;

Título em inglês: Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

Abstract (e não Summary): Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado;

Keywords: idem

Introdução: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Material e Métodos: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Resultados e Discussão: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Preferivelmente evitar a separação destes tópicos)

Conclusões: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Agradecimentos: (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Referências: (e não bibliografia) Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem estar em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor, seguindo a NBR 6023, da ABNT. Não colocar nenhum tipo de recuo no parágrafo.

Para as submissões em língua inglesa, a tipografia e espaçamentos são os mesmos, na seguinte sequência:

Título em inglês (Title);

Abstract;

Keywords;

Título em português (obrigatório);

Resumo em português (obrigatório);

Palavras-chave;

Introduction;

Material and Methods;

Results and Discussion;

Conclusions;

Acknowledgments (opcional)

References

Exemplos de referências

Trabalho em Periódicos:

PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. FRANCO, S. L.; PRADO, I. N. do; JACOBI, G. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em bubalinos alimentados com dietas a base de forragem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.9, p.2055-2065, 2010.

Livros:

BURLEY, R.W.; VADEHRA, D.V. *The Avian Egg: Chemistry and Biology*. John Wiley and Sons, New York, NY, 372p, 1989. p 68–71.

SOROPOSITIVIDADE DA BRUCELOSE SUÍNA NO BRASIL E SITUAÇÃO ATUAL DAS TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO SOROLÓGICO

Acácia Ferrreira Vicente¹ e Jane Megid^{2*}

¹Pós graduanda na FMVZ, UNESP – Botucatu, SP.

² Professora titular na FMVZ, UNESP – Botucatu, SP. - jane@fmvz.unesp.br

RESUMO

Carne suína é a proteína mais consumida no mundo e o Brasil é o quarto maior produtor e exportador mundial deste tipo de carne. A importância deste animal no mercado de alimentos exige um controle apropriado com relação a doenças. A brucelose é uma zoonose que causa infecção crônica em suínos. A transmissão ocorre por ingestão de água e alimentos contaminados com descargas vulvares, resíduos de membranas fetais e sêmen. Os principais sinais clínicos envolvem distúrbios reprodutivos. A infecção em humanos ocorre através do contato direto com os animais, a ingestão de carne crua ou mal cozida levando a uma doença debilitante. O diagnóstico sorológico da infecção por *B. suis* e *B. abortus* são realizadas utilizando o mesmo antígeno. A OIE determina o uso de ELISA direto e competitivo, AAT e a polarização de fluorescência no diagnóstico de *B. suis*, enquanto o MAPA padroniza AAT, 2-ME e CF como testes de diagnóstico no controle da brucelose em suínos. O objetivo deste artigo de revisão foi abordar os aspectos mais importantes da brucelose em suínos, bem como o levantamento sorológico da doença no Brasil nos últimos 20 anos e o estado atual das técnicas de diagnóstico sorológico da brucelose suína.

Palavras chave: Brucelose suína, epidemiologia, sorologia, técnicas de diagnóstico sorológico.

SWINE BRUCELLOSIS SEROPOSITIVITY IN BRAZIL AND CURRENT SITUATION OF SEROLOGICAL DIAGNOSTIC TECHNIQUES

ABSTRACT

Pork meat is the most consumed protein worldwide and Brazil is the fourth largest producer and exporter of this meat type. Considering the importance of this animal in the food market an appropriated survey regarding diseases. Brucellosis is a zoonotic disease that causes chronic infection in pigs. Transmission occurs due ingestion of water and food source contaminated with vulvar discharges, residues of fetal membranes and the semen. Main clinical signs involve reproductive disorders. Infection in humans occurs through direct contact with animals, ingestion of raw or undercooked meat leading to a debilitating illness. Serological brucellosis test of *B. suis* infection and *B. abortus* are carried out using the same antigen. OIE procedures, determine the use of direct and competitive ELISA, RBT and, fluorescence polarization in *B. suis* diagnosis, while MAPA standardizes RBT, 2-ME and CF as diagnostic tests in brucellosis control in swine. The purpose of this review article was to approach the most important aspects of brucellosis in swine as well as the serological survey of this disease in Brazil in the last 20 years and the current status of serological diagnostic techniques in swine brucellosis.

Keywords: Swine brucellosis, epidemiology, serology, serological diagnostic techniques.

INTRODUÇÃO

A carne suína é a fonte de proteína mais consumida no mundo, variando entre regiões, hábitos de vida, proibições religiosas ou dogmáticas. Está cada vez mais presente na dieta da população por ser um alimento rico em nutrientes, suprimindo as necessidades do organismo com altas concentrações de vitaminas e minerais em relação ao seu valor energético (ABIPECS, 2013).

A Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne suína (ABIPECS) apontou o Brasil como o quarto produtor e exportador mundial, exportando para 60 países diferentes o total de 581 mil toneladas no ano de 2012. A cadeia produtiva suína envolve ao redor de um milhão de pessoas no país, sendo considerada uma das mais importantes atividades do agronegócio nacional. O alto consumo de carne exige do sistema de vigilância sanitária padrões rígidos de controle de doenças infecciosas e parasitárias, minimizando os riscos para a saúde pública (ABIPECS, 2013).

O primeiro relato do isolamento da bactéria foi por David Bruce no ano de 1886 em Malta, e em 1914, nos Estados Unidos, foi isolado pela primeira vez *B. suis* de aborto suíno (Nicoletti, 2002). Os relatos de novas espécies e da patogenia da enfermidade em animais e humanos vêm surgindo a cada ano.

A brucelose em suínos é uma enfermidade muito difundida em várias áreas no mundo, especialmente na América Latina e sudeste da Ásia. Em menor prevalência também é encontrada em algumas regiões da Ásia, Europa e América do Norte (McGiven *et al.*, 2012). Os programas de erradicação e controle da doença orientam utilizar testes sorológicos para o diagnóstico. Porém, não há nenhum teste sorológico específico para o diagnóstico da doença em suínos (Muñoz *et al.*, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi descrever a brucelose suína e sua epidemiologia no Brasil nos últimos 20 anos, bem como a situação atual do diagnóstico sorológico visto a importância na atividade pecuarista no Brasil e na saúde pública.

BRUCELOSE

Brucelose é uma infecção crônica que se caracteriza por quadro clínico variado em animais e apresenta-se como enfermidade debilitante em humanos. É causada por bactérias do gênero *Brucella* spp., Gram-negativas e intracelulares facultativas (Ko e Splitter, 2003). As espécies de *Brucella* não são específicas quanto ao hospedeiro que infectam, embora seja conhecida certa predileção por determinada espécie animal (Bargen *et al.*, 2012). Atualmente são reconhecidas 10 espécies: *B. abortus* (bovinos e bubalinos), *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. suis* (suínos), *B. canis* (caninos), *B. ovis* (ovinos) e *B. neotomae* (rato do deserto), sendo essas reconhecidas como espécies clássicas; foram descritas, recentemente, as espécies marinhas *B. ceti* (cetáceos) e *B. pinnipedialis* (pinípedes), *B. microti* (roedores e raposas) e *B. inopinata* (isolada de prótese mamária humana).

A bactéria *Brucella* tem como principal componente de sua parede celular o lipopolissacarídeo (LPS). A estrutura deste determina a morfologia das colônias em lisas ou rugosas. As colônias lisas possuem um LPS completo, o qual é composto por um lipídio A, seguido de um oligossacarídeo e uma cadeia O-polissacarídeo. As rugosas diferenciam-se por não possuir a cadeia O-polissacarídeo. *B. canis* e *B. ovis* são espécies naturalmente rugosas e as demais são consideradas lisas (Whatmore, 2009).

Atualmente, três vacinas comerciais são recomendadas pela World Organization for Animal Health (Office International des Epizooties – OIE) para a profilaxia e controle da doença em bovinos e búfalos contra *B. abortus* (RB51 e B19) e de caprinos e ovinos contra *B. melitensis* (Rev. 1). No entanto, não são encontradas vacinas para outros animais e humanos (Ko & Splitter 2003).

BRUCELOSE EM SUÍNOS

B. suis se diferencia em cinco biovars denominados: 1, 2 e 3, que infectam geralmente suínos e javalis, sendo a lebre europeia (*Lepus europaeus*) considerada reservatório do biovar 2. O biovar 4 infecta principalmente renas e alces, e é pouco encontrada em suínos, enquanto o biovar 5 está presente somente em roedores (Di Febo *et al.*, 2012). No Brasil, somente o biovar 1 foi isolado, de suínos, até o momento. Dentre as cinco biovariedades, os biovars 1 e 3 são mais patogênicos para os humanos. O biovar 2 foi relatado somente em alguns casos de pacientes imunossuprimidos (Abril

et al., 2011). Na região do ártico, incluindo Sibéria, Canadá e Alasca, o biovar 4 constitui um sério problema zoonótico (OIE, 2009).

Suínos de qualquer idade podem contrair a enfermidade, mas a susceptibilidade maior ocorre durante a maturidade sexual entre oito e dez meses de idade. A doença se dissemina rapidamente na granja, com taxa de morbidade entre 50 e 80%, podendo comportar-se como epidemia quando recém ingressa numa criação, causando surtos de abortos. A mortalidade e a letalidade entre animais adultos são insignificantes (Jesus *et al.*, 2010).

Os suínos contraem a enfermidade pela ingestão de água e alimentos contaminados por descargas vulvares ou de fetos abortados e membranas fetais de matrizes infectadas. Uma vez a doença estabelecida na criação, a transmissão por via genital torna-se mais comum. Machos adquiridos sem exames prévios e aparentemente saudáveis podem introduzir a doença numa criação livre de brucelose, uma vez que podem apresentar ou não alterações nos órgãos sexuais ou na atividade sexual (Silva *et al.*, 2009; Jesus *et al.*, 2010). Outra forma de infecção das fêmeas é pela inseminação artificial realizada com sêmen contaminado com *B. suis* (Bianchi *et al.*, 2006).

PATOGENIA

Em muitos tecidos os macrófagos constituem a primeira linha de defesa da resposta imune inata contra micro-organismos. Estas células eucariotas são dedicadas a eliminar partículas estranhas por fagocitose. Apesar dessa função, patógenos desenvolveram maneiras de contornar esse mecanismo de defesa evitando sua destruição, e no caso de patógenos intracelulares, conseguir multiplicar-se dentro destas células. Este é o caso da *Brucella* spp., seu potencial patogênico depende exclusivamente da habilidade da bactéria entrar, sobreviver e se replicar dentro das células hospedeiras (Xavier *et al.*, 2010). Este micro-organismo é bem adaptado ao ambiente intracelular dos mamíferos. Essa característica é exemplificada pela sua capacidade de controlar seu próprio tráfego intracelular para evitar a degradação lisossomal, multiplicar extensivamente dentro de uma célula hospedeira sem restringir as funções celulares básicas ou induzir a morte celular (Celli, 2006).

Brucella spp. podem multiplicar-se em células fagocíticas ou não, porém, possui maior tropismo por macrófagos, células dendríticas e trofoblastos. Para alcançar as células alvo, precisa atravessar as mucosas do trato respiratório, digestivo ou genital,

onde sofre fagocitose e alcança os linfonodos regionais, levando a posterior disseminação sistêmica (Xavier *et al.*, 2010; Godfroid *et al.*, 2011; Bargen *et al.*, 2012). Ocorre bacteremia intermitente por várias semanas, geralmente sem sinais clínicos. Em continuidade, ocorre a localização no tecido linfóide, fígado, baço, rins, articulações e órgãos reprodutivos. Os gânglios mandibulares, gastro-hepáticos, ilíacos internos e retrofaringeanos são os principais linfonodos onde *B. suis* são isoladas em suínos. Em geral, a bacteremia ocorre de uma semana a trinta e quatro meses após a infecção (Deyoe e Manthei, 1967).

Em tecidos, os macrófagos são importantes para a multiplicação intracelular de *Brucella* spp., apesar de mais de 90% serem mortas logo após sua fagocitose (Bargen *et al.*, 2012). A sobrevivência e multiplicação nessas células são devidas a fatores de virulência considerados responsáveis pelo estabelecimento, desenvolvimento e cronicidade da infecção, já que a bactéria escapa dos mecanismos de defesa extracelular, como os anticorpos e sistema complemento (Ko e Splitter 2003; Bargen *et al.*, 2012). As células dendríticas são excelentes carreadoras deste micro-organismo por possuírem propriedades migratórias contribuindo para a disseminação sistêmica da bactéria durante a infecção. Já os trofoblastos são células alvo durante a fase de gestação. A capacidade da *Brucella* spp. de multiplicar-se rapidamente em grandes quantidades dentro dessas células pode comprometer a integridade da placenta resultando na infecção do feto e consequente aborto ou nascimento de natimortos ;nos machos pode causar esterilidade (Xavier *et al.*, 2010; Bargen *et al.*, 2012).

O suíno infectado tende a apresentar altos níveis de *B. suis* em seus tecidos quando comparado com o bovino infectado com *B. abortus* (Meirelles-Bartoli *et al.*, 2012).

SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos vão variar dependendo da idade do animal, tempo de exposição e órgão acometido (Megid *et al.*, 2010). Em fêmeas, a manifestação mais comum da doença é o aborto, que pode ocorrer em qualquer estágio da gestação, sendo influenciada pelo tempo de exposição ao agente (Jesus *et al.*, 2010). Quando não ocorre aborto pode ocorrer nascimento de natimortos e leitões doentes (Deyoe e Manthei, 1967). Descargas vaginais nem sempre são evidentes e em rebanhos cronicamente infectados a infertilidade é o sinal clínico mais relevante da doença (OIE, 2009). Uma

porcentagem reduzida de animais que abortam, continuam eliminando *B. suis* em descargas vaginais por longo período de tempo podendo chegar a trinta meses (Deyoe e Manthei, 1967).

Nos machos predomina a orquite, podendo ocorrer necrose testicular e epididimite (Jesus *et al.*, 2010). Um percentual dos animais infectados recuperam-se da infecção em torno de 6 meses, no entanto, a grande maioria permanece infectado por vários anos. A infecção dos órgãos genitais é menos duradoura nas fêmeas, ao contrário do que ocorre nos machos, podendo persistir durante toda a vida (OIE, 2009).

Leitões na fase de amamentação e desmamados, geralmente, apresentam espondilite associada à paralisia dos membros posteriores e rarefação óssea (Deyoe e Manthei, 1967). Estes sinais podem ser observados em animais de qualquer idade e em ambos os sexos, podendo ocorrer também artrite, laminite e o aparecimento de abscessos de diferentes tamanhos em órgãos e tecidos (Megid *et al.*, 2010).

EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE SUÍNA NO BRASIL

Relatos da ocorrência de suínos soropositivos no Brasil são escassos (Tabela 1). No estado de São Paulo, Feitosa *et al.* (1991) realizaram levantamento sorológico de dez anos, correspondente ao período de 1977 a 1987. Este estudo envolveu bovinos, bubalinos, caninos, caprinos, equinos, suínos e humanos. Dos 12.706 soros suínos analisados, 1.681 (13,23%) foram positivos na prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) para brucelose. Na região sul deste mesmo estado, foram avaliadas 42 amostras de sangue de propriedade sem os devidos cuidados de sanidade, e em 37 (88,09%) obteve-se resultado positivo na prova sorológica (Roxo *et al.*, 1996), reforçando que as granjas que possuem menor tecnologia na criação e instalações pouco adequadas quanto à biosseguridade, são mais vulneráveis à entrada de patógenos (Borges *et al.*, 2011).

Freitas *et al.* (2001) submeteram à prova de AAT, 139 amostras de soros de suínos encontrando 42,2% de amostras positivas. Estes dados são extremamente preocupantes, já que os soros eram procedentes de suínos de abate clandestino.

Foram realizadas em cinco granjas comerciais da Zona da Mata de Pernambuco as provas sorológicas de soroaglutinação lenta (SAL) e de 2-mercaptoetanol (2-ME) em 972 suínos. Destes, 309 (31,8%) foram positivos na SAL e oito positivos no 2-ME. Fatores como idade, manejo higiênico sanitário e inseminação artificial influenciaram

nos resultados positivos. Neste estudo foi justificada a elevada soropositividade pela falta de conhecimento da maioria dos criadores a respeito da brucelose suína e, conseqüentemente, a necessidade de adoção de medidas de controle e profilaxia contra a doença (Ribeiro *et al.*, 2001). Por outro lado, no estado de Goiás, Matos *et al.* (2004) examinaram 829 amostras de suínos de 40 granjas pertencentes a 22 municípios, das quais 37 mantinham os animais em confinamento e em três os reprodutores e leitões eram mantidos ao ar livre. Foi verificado que apenas um animal foi reagente, reforçando que na produção tecnificada e com rigoroso esquema de saúde a brucelose suína pode ser controlada ou erradicada.

Aguiar *et al.* (2006) avaliaram propriedades rurais que desenvolvem agricultura familiar no município de Monte Negro (RO). Foi realizado AAT de 104 animais encontrando um suíno positivo que, no entanto, resultou negativo nas provas SAL e 2-ME. Silva *et al.* (2009) também não encontraram resultados positivos para brucelose em 342 suínos no estado de Alagoas. Este estudo foi realizado em granjas de animais em confinamento total em com prática de inseminação artificial.

Motta *et al.* (2010), em estudo contemplando 13 estados brasileiros, analisaram soros procedentes de granjas de suínos, javalis e criatórios de suídeos (explorações de subsistência, sem característica comercial). Foram encontrados animais reagentes no AAT que variaram entre 0,2% em javalis e 100% em granjas suínas. No entanto, estes soros foram negativos nas provas de SAL e 2-ME. No mesmo ano, em estudo realizado no estado do Rio de Janeiro por Jesus *et al.* (2010) encontraram 12,8% de fêmeas reagentes no AAT.

No estado de São Paulo, Borges *et al.* (2011) realizaram AAT, SAL, 2-ME e fixação de complemento (FC) em soros procedentes de dez granjas de reprodutores de suídeos certificadas. Do total de amostras, nove foram reagentes no AAT, embora fossem negativas nas outras provas realizadas.

Meirelles-Bartoli *et al.* (2012), durante surto de *B. suis* em Jaboticabal (SP), submeteram o soro de matrizes e animais em terminação às provas do AAT, 2-ME e FC. De 271 matrizes analisadas, 257 (94,8%) foram reagentes no AAT, 250 (92,3%) foram reagentes na prova 2-ME e 254 (93,7%) no FC. Já os 62 animais em terminação testados, 19 foram reagentes no teste AAT (30,6%), no 2-ME testaram positivos 15 (24,2%) e 17 (27,4%) no FC.

No estudo mais recente realizado no estado de São Paulo, Rosa *et al.* (2012) realizaram a prova AAT em 910 soros de suínos de 30 diferentes propriedades,

encontrando 25 (3%) animais reagentes. Destes, 21 também foram positivos na SAL e somente 2 no 2-ME.

Azevedo *et al.* (2012), no estado da Paraíba, realizaram a prova AAT em 306 soros de suínos abatidos no matadouro público de Patos. Três animais foram positivos para anticorpos contra *Brucella* no AAT, destes, 2 positivos no 2-ME.

Tabela 1. Estudos sorológicos da infecção de *Brucella* spp. em suídeos realizados no Brasil (1991-2012).

Estado	Nº amostras avaliadas	Técnica (nº amostras positivas)						Referência
		AAT	SAL	2-ME	FC	CT	SAR	
São Paulo	1.681	223	-	-	-	-	-	Feitosa et al. 1991
São Paulo	42	37	-	-	-	-	-	Roxo et al. 1996
Pará	139	-	-	-	-	59	59	Freitas et al. 2001
Pernambuco	972	-	309	8	-	-	-	Ribeiro et al. 2001
Goiás	829	-	-	-	-	1	-	Matos et al. 2004
Rondônia	104	1	0	0	-	-	-	Aguiar et al. 2006
Alagoas	342	0	-	-	-	-	-	Silva et al. 2009
13 estados ^a e DF	27.300	* ^b	0	0	-	-	-	Motta et al. 2010
Rio de Janeiro	282	25	-	-	-	-	-	Jesus et al. 2010
São Paulo	2.085	9	-	0	0	-	-	Borges et al. 2011
São Paulo	333	276	-	265	271	-	-	Meirelles-Bartoli et al. 2012
São Paulo	910	25	21	2	-	-	-	Rosa et al. 2012
Paraíba	306	3	-	2	-	-	-	Azevedo et al. 2012

AAT = Antígeno Acidificado Tamponado / SAL = Soroaglutinação Lenta / 2-ME = 2 Mercaptoetanol / FC = Fixação de Complemento / CT = “Card Test” / SAR = Soroaglutinação Rápida

^a Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins e Distrito Federal.

^b Dependendo do Estado variou de 0,2 a 100%.

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico definitivo é o isolamento da *B. suis* de animais infectados (Di Febo *et al.*, 2012; Praud *et al.*, 2012). Porém é um processo lento, caro e impraticável para ser realizado em uma grande população (Muñoz *et al.*, 2012).

O teste cutâneo de brucelina é, em alguns países, amplamente utilizado para identificar rebanhos infectados, sendo ótimo para diferenciação da brucelose de reações sorológicas falso positivas (Di Febo *et al.*, 2012), entretanto, a brucelina não está mais disponível no mercado internacional (Muñoz *et al.*, 2012).

O diagnóstico pode ser baseado na observação dos sinais clínicos associado com sorologia positiva (Praud *et al.*, 2012). O diagnóstico sorológico é muito utilizado para o controle da doença nos criatórios. Porém, os testes sorológicos para brucelose em suínos são baseados nos mesmos testes que são utilizados para diagnóstico de brucelose em bovinos, utilizando *B. abortus* como antígeno visto que *B. suis* é uma cultura lisa (Jesus *et al.*, 2010).

BRUCELOSE EM HUMANOS

Os humanos podem adquirir a brucelose pelo contato com secreções de animais infectados, contendo a bactéria que invadem cortes ou abrasões, pela inalação ou contaminação da conjuntiva por aerossóis ou através da ingestão de leite e seus derivados não pasteurizados e carne mal passada ou crua (Hartigan, 1997).

A doença é septicêmica nos humanos e manifesta-se por febre contínua, intermitente ou irregular. A irregularidade da febre é tão variável que a temperatura de um doente pode ser normal pela manhã e subir até aos 40°C à tarde. Outros sintomas são insônia, impotência sexual, anorexia e letargia. A doença pode permanecer durante semanas, meses ou anos (Seleem *et al.*, 2010). Em pacientes previamente saudáveis geralmente a brucelose não é letal, porém, na ausência de tratamento, pode conduzir a uma infecção crônica com episódios clínicos debilitantes chegando a complicações severas tais como endocardite, meningoencefalite, artrite, espondilite, orquite e distúrbios psicológicos (Whatmore, 2009).

Para o tratamento utiliza-se associação de antibióticos, das quais a combinação entre doxiciclina e estreptomicina é referida como a mais utilizada. O tratamento geralmente é efetivo. No entanto, devido à natureza crônica da doença, podem ser

observadas recidivas e acometimento das articulações. Caso o paciente não seja tratado, podem ocorrer complicações severas como formação de abscessos no fígado, endocardite e até acometimento do sistema nervoso (Bargen *et al.*, 2012). A taxa de mortalidade é estimada em aproximadamente 5% dos casos, devido a complicações (Di Febo *et al.*, 2012). Hipersensibilidade alérgica a antígenos de brucela é uma consequência frequente da doença após a reinfecção ou contato repetido com antígenos da bactéria (Bargen *et al.*, 2012).

No Brasil, os indivíduos mais expostos ao risco de infecção são representados por aqueles que possuem contato direto com os animais, como veterinários e criadores, além de contato com produtos de origem animal como magarefes e funcionários de frigoríficos, bem como pessoas que lidam diretamente com o patógeno em laboratórios de diagnóstico e pesquisa (Azevedo *et al.*, 2012). No Brasil não se tem registro de isolamento de *B. melitensis*, considerada a espécie mais patogênica para os humanos. Uma grande preocupação são as espécies *B. abortus* e *B. suis*, que ocorrem predominantemente de forma ocupacional (Mathias, 2008). Em países onde ocorre a atividade de caça de javalis, há relatos de casos de infecção humana por *B. suis* (Carrington *et al.*, 2012).

PREVENÇÃO E CONTROLE

Para controlar a brucelose no homem é necessário controlar a doença nos animais. Não há vacinas disponíveis contra *B. suis*, portanto o controle da doença é feito por programas adequados de manejo e higiene nos criatórios junto com a realização periódica de testes sorológicos nos animais.

A transcrição da normativa 19 de 15 de fevereiro de 2002 (Brasil, 2002) determina que em toda granja certificada (GRSC) os animais (reprodutores machos e fêmeas) deverão ser submetidos a provas sorológicas, com intervalo de seis meses, utilizando o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) ou outro aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e indicado para o caso, devendo os soros reagentes serem submetidos a provas complementares do 2-mercaptoetanol (2-ME) ou fixação de complemento (FC). A granja de reprodutores terá cumprido as condições sorológicas para a brucelose se todos os testes forem negativos. No caso de positividade, a granja terá sua certificação suspensa, eliminando os positivos

e retestando o plantel, na sua totalidade em até 30 dias; persistindo a positividade, a granja perderá a certificação.

SITUAÇÃO ATUAL DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

A OIE (2009) descreve como testes sorológicos disponíveis para brucelose suína o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) indireto e competitivo, AAT, polarização fluorescente e FC, sendo o AAT indicado como um dos melhores testes para diagnóstico de infecção por *Brucella* spp. em suínos, recomendado para exportação dos animais, e não considera o teste de FC adequado para diagnóstico da brucelose em suínos. No Brasil, o MAPA descreve o AAT, 2-ME e FC como testes diagnósticos para o controle da doença dentro do país (Brasil, 2002).

O diagnóstico da brucelose é geralmente realizado com uma combinação de métodos, pois nenhum destes testes mencionados são completamente satisfatórios para diagnóstico da doença em suínos, podendo ocorrer reação cruzada com outras bactérias Gram-negativas, especialmente *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:9. Isto ocorre devido à estrutura do antígeno O-LPS serem similares às espécies de *Brucella* lisas. Esta reação falso positiva diminui a especificidade de muitos testes diagnósticos (Di Febo *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2012). Além do mais, a presença de anticorpos não específicos, provavelmente IgM, também reduz a especificidade destes testes convencionais, especialmente para testes de aglutinação (Di Febo *et al.*, 2012). Por essa questão, há várias pesquisas sendo realizadas por todo o mundo na tentativa de padronização de uma técnica para o diagnóstico da brucelose em suínos.

Di Febo *et al.* (2012) sugeriram que a combinação dos métodos ELISA competitivo e indireto (c-ELISA e i-ELISA) com polarização fluorescente aumenta a sensibilidade e especificidade fornecendo uma solução apropriada para o diagnóstico sorológico de brucelose suína. Já Muñoz *et al.* (2012) realizaram o AAT com 100% de especificidade e sensibilidade, ao contrário de outras literaturas que não encontram estes resultados no teste, e justificam a discrepância pelo tipo de antígeno utilizado neste teste que pode interferir na sensibilidade diagnóstica para o diagnóstico da população em estudo e pelo critérios metodológicos utilizados.

McGiven *et al.* (2012) analisaram diferentes testes diagnósticos em 4 diferentes grupos: livres de *Brucella* spp., positivos para *B. suis*, falso positivos no AAT e soro de animais positivos para *Y. enterocolitica*. Dentre os testes o AAT obteve melhor

desempenho nos gupos sabidamente positivos e negativos para *Brucella* com 100% de sensibilidade diagnóstica, nos demais grupos houve falta de especificidade onde mais de 50% das amostras resultaram positivas. Dentre as técnicas, o i-ELISA com antígeno constituído de lipopolissacarídeo de amostra lisa (L-LPS) apresentou melhor especificidade diagnóstica na população livre de *Brucella*. Os testes i-ELISA constituído de lipopolissacarídeo de amostra rugosa (R-LPS), TR-FRET e c-ELISA (ambos L-LPS) mostraram características diagnósticas similares com especificidade diagnóstica melhor que a apresentada pelo teste AAT. Os resultados da PF foram diagnosticamente inferiores aos testes acima mencionados.

Praud *et al.* (2012) compararam os testes polarização fluorescente, AAT, i-ELISA e dois c-ELISA com o desempenho do FC. Os resultados apresentaram que o c-ELISA obteve melhor desempenho, sendo o teste diagnóstico sorológico mais sensível e específico dos analisados, porém não sensível e específico o suficiente para ser utilizado sozinho para diagnóstico da brucelose suína. Este grupo de pesquisadores levou em conta que animais nas fases iniciais da infecção não podem ser detectados por testes sorológicos, uma vez que a persistência de anticorpos não é estritamente proporcional à obtenção do resultado positivo para o teste.

Nenhum dos testes sorológicos disponíveis mostrou-se confiável para ser usado sozinho no diagnóstico da brucelose em suínos. Os resultados mostrados nos trabalhos citados reafirmam a questão das reações cruzadas nos testes de diagnóstico sorológico e demonstra a necessidade de um método para solução deste problema.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A divergência dos testes sorológicos recomendados no Brasil frente a literatura internacional sugere a necessidade de reavaliação das técnicas para o diagnóstico da brucelose suína no país, tendo em vista a discrepância de resultados entre os diferentes testes sorológicos utilizados nos estudos.

A presença de suínos reagentes em idade de abate é preocupante, visto que suínos soropositivos para a brucelose provavelmente estão sendo encaminhados para abate clandestino, ou mesmo expondo os magarefes em abatedouros ao risco ocupacional. Desta forma, é de extrema importância a adoção de certas medidas preventivas, como o uso de luvas para manejar esses animais, bem como outras medidas de biossegurança necessárias.

REFERÊNCIAS

- ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acessado em: 16 de mar. 2013.
- ABRIL, C.; THOMANN, A.; BRODARD, I. WU, N.; RYSER-DEGIORGIS, M.P.; FREY, J.; OVERESCH, G. A novel isolation method of *Brucella* species and molecular tracking of *Brucella suis* biovar 2 in domestic and wild animals. *Veterinary Microbiology*, v.50, p.405-410, 2011.
- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; DIB, C.C.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, E.M.S.; LARA, M.C.C.S.H.; RODRIGUEZ, C.A.R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAES, Z.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A; GENNARI, S.M. Anticorpos contra agentes bacterianos e virais em suínos de agricultura familiar do município de Monte Negro, RO. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.73, p.415-419, 2006.
- AZEVEDO, S.S.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, M.L.C.R.; MACEDO, M.M.S.; SANTOS, C.S.A.B.; ALVES, C.J.; HIGINO, S.S.S. Anticorpos contra brucelas lisas em suínos abatidos no semiárido da Paraíba. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.79, p.97-99, 2012.
- BARGEN, K.; GORVEL, J.P.; SALCEDO, S.P. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiology Reviews*, v.36, p.533-562, 2012.
- BORGES, S.R.T.; SOUZA, L.C.; SILVA, R.C.; ALMEIDA, E. Avaliação dos níveis de biosseguridade das granjas de reprodutores suínos certificadas no estado de São Paulo, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, v.18, p.417-431, 2011.
- BRASIL 2002. Instrução Normativa nº 19, de 19 de fevereiro de 2002, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Aprova as normas a serem cumpridas para certificação de granjas de reprodutores suídeos. *Diário Oficial República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília*.
- BIANCHI, I.; SCHAAF, S.; CORRÊA, E.K.; PERONDI, A.; LUCIA JR, T.; DECHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.30, p.72-77, 2006.
- CARRINGTON, M.; CHOE, U.; UBILLOS, S.; STANEK, D.; CAMPBELL, M.; WANSBROUGH, L.; LEE, P.; CHURCHWELL, G.; ROSAS, K.; ZAKI, S.R.; DREW, C.; PADDOCK, C.D.; DELEON-CARNES, M.; GUERRA, M.; HOFFMASTER, A.R.; TILLER, R.V.; DE, B.K. Fatal case of Brucellosis misdiagnosed in early stages of *Brucella suis* infection in a 46-year-old patient with marfan syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, v.50, p.2173-2175, 2012.
- CELLI, J. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Research in Microbiology*, v.157, p.93-98, 2006.
- DEYOE, B.L.; MANTHEI, C.A. 1967. Site of location of *Brucella suis* in swine. *Proceedings of the 71 Annual Meeting Journal of the United States Livestock*, v.71, p.102-108, 1967.
- DI FEBBO, T.; LUCIANI, M.; PORTANTI, O.; BONFINI, B.; LELLI, R.; TITTARELLI, M. Development and evaluation of diagnostic tests for the serological diagnosis of brucellosis in swine. *Veterinaria Italiana*, v.48, p.133-156, 2012.
- FEITOSA, M.H.; BITTAR, C.R.; Gomes S.P. Brucelose: levantamento sorológico no estado de São Paulo no período de 1977 a 1987. *Veterinária e Zootecnia*, v.3, p.9-15, 1991.
- FREITAS, J.A.; GALINDO, G.A.R.; SANTOS, E.J.C.; SARRAF, K.A.; OLIVEIRA, J.P. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. *Revista Saúde Pública*, v.35, p.101-102, 2001.

GODFROID, J.; SCHOLZ, H.C.; BARBIER, T.; NICOLAS, C.; FRETIN, D.; WHATMORE, A.M.; CLOCKAERT, A.; BLASCO, J.M.; MORIYON, I.; SAEGERMAN, C.; MUMA, J.B.; AL DAHOUK, S.; NEUBAUER, H.; LETESSON, J.J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21 st century. Preventive Veterinary Medicine, v.102, p.118-131, 2011.

HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. Irish Veterinary Journal, v.50, p.179-180, 1997.

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

KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clinical Microbiology Reviews, v.16, p.65-78, 2003.

MATHIAS, L.A. Brucelose animal e suas implicações em saúde pública. Biológico, v.70, p.47-48, 2008.

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

MCGIVEN, J.A.; NICOLA, A.; COMMANDER, N.J.; DUNCOMBE, L.; TAYLOR, A.V.; VILLARI, S.; DAINTY, A.; THIRLWALL, R.; BOUZELMAT, N.; PERRETT, L.L.; BREW, S.D.; STACK, J.A. An evaluation of the capability of existing and novel serodiagnostic methods for porcine brucellosis to reduce false positive serological reactions. Veterinary Microbiology, v.160, p.378-386, 2012.

MEGID, J.; MATHIAS, L.A.; ROBLES, C.A. 2010. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. The Open Veterinary Science Journal, v.4, p.119-126, 2010.

MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS, L.A.; SAMARTINO, L.E. Brucellosis due to *Brucella suis* in a swine herd associated with a human clinical case in the State of São Paulo, Brazil. Tropical Animal Health and Production, v.44, p.1575-9, 2012.

MOTTA, P.M.C.; FONSECA JUNIOR, A.A.; OLIVEIRA, A.M.; NASCIMENTO, K.F.; SOARES FILHO, P.M.; SERRA, C.V.; JESUS, A.L.; RIVETTI JUNIOR, A.V.; RAMALHO, A.K.; MOTA, P.M.P.C.; ASSIS, R.A. Inquérito soropidemiológico para brucelose em suídeos do Brasil. Veterinaria em Foco, v.7, p.141-147, 2010.

MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; ENGEL, B.; DE MIGUEL, M.J.; MARÍN, C.M.; DIESTE, L.; MAIAR-JAIME, R. Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. Veterinary Immunology Immunopathology, v.146, p.150-158, 2012.

NICOLETTI, P. 2002. A short history of brucellosis. Veterinary Microbiology, v.90, p.5-9, 2002.

OIE. Porcine Brucellosis. NB: Version adapted by the World Assembly of Delegates of the Office International des epizooties, Paris, France, 2009.

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

RIBEIRO, T.C.F.S.; MOTA, R.A.; COSTA, A.N.; LIMA, E.T.; CASTRO JUNIOR, I.F. Inquérito soropidemiológico da brucelose suína em granjas comerciais da Zona de Mata de Pernambuco. Ciência Animal, v.11, p.65-71, 2001.

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

ROXO, E.; BERSANO, J.G.; PORTUGAL, M.A.S.C. *Brucella suis* em diversas espécies de animais numa mesma propriedade rural. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.63, p.11-14, 1996.

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

SILVA, M.A.; SOUZA, L.C.A.; SANTANA, F.C.; VALENÇA, R.M.B.; MOTA, R.A. Inquérito soroepidemiológico da infecção por *Brucella* spp. em granjas suícolas tecnificadas no estado de Alagoas. *Anais VI Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*, Maringá, PR, 2009.

XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; HARTIGH A.B.; TSOLIS, R.M.; SANTOS, R.L. Pathogenesis of *Brucella* spp.. *The Open Veterinary Science Journal*, v.4, p.109-118, 2010.

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

CAPITULO 3 – Trabalho Científico

Trabalho a ser enviado para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Normas para publicação da revista:

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no

texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian &

Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

I.Avaliação dos meios de cultura Agar *Brucella*, Farrel e CITA; II. Pesquisa de *Brucella* spp. em linfonodos de suínos e javalis com linfadenite pelos diferentes meios¹

Acácia F. Vicente², João M.A.P. Antunes², Gustavo H.B. Lara², Mateus S.R. Mioni², Susan D. Allendorf², Marina G. Peres², Marcio G. Ribeiro³ e Jane Megid^{3*}

ABSTRACT.- Vicente A.F., Antunes J.M.P, Lara G.H.B., Mioni M.S.R., Allendorf S.D., Peres M.G., Ribeiro M.G. & Megid J. 2013. **[I.Evaluation of *Brucella* agar, Farrell and CITA medium culture; II. Research for *Brucella* spp. in lymph nodes of pigs and wild boars with lymphadenitis by different media.]** I.Avaliação dos meios de cultura Agar *Brucella*, Farrell e CITA; II. Pesquisa de *Brucella* spp. em linfonodos de suínos e javalis com linfadenite pelos diferentes meios. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Dist. de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: jane@fmvz.unesp.br

Three culture media (*Brucella* agar, *Brucella* agar supplemented with Farrell and CITA) were compared considering the contamination inhibition and sensitivity to *Brucella* spp. isolation. The results demonstrated that CITA and Farrell media were the best for the isolation of *Brucella* spp. by inhibiting the growth of microorganisms and contaminants. Considering these results 100 lymphnodes from pigs (n=50) and wild boars (n=50) with lymphadenitis (n=50) collected in slaughterhouses in the State of São Paulo were evaluated to search for *Brucella* spp. All samples resulted negative for *Brucella* spp. isolation with the three culture media.

INDEX TERMS: Swine brucellosis, lymphadenitis, Farrell, CITA.

1 Recebido em

Aceito para publicação em

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Dist. de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

3 Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estado de São Paulo – UNESP, Dist. de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. *Autor para correspondência: jane@fmvz.unesp.br

RESUMO.- Três meios de cultura (Agar *Brucella*, Agar *Brucella* suplementado com Farrell e CITA) foram comparados considerando a inibição de contaminação e a sensibilidade para o isolamento de *Brucella* spp.. os resultados demonstraram que os meios CITA e Farrell foram os melhores para isolar a *Brucella* spp. por inibir o crescimento de microorganismos e contaminates. Considerando os resultados 100 linfonodos de suínos (n=50) e javalis (n=50) com linfadenite, coletados em abatedouros no estado de São Paulo, foram avaliados para pesquisa de *Brucella* spp.. Todas as amostras resultaram negativas para *Brucella* spp. no isolamento com os três meios de cultura.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose suína, linfadenite, Farrell, CITA.

INTRODUÇÃO

Brucella spp. são bactérias Gram-negativas intracelulares facultativas, que não se multiplicam no ambiente, e usualmente são transmitidas diretamente entre os hospedeiros. Estes microorganismos são responsáveis por causar enfermidade que possui clínica variável, dependendo do hospedeiro e da espécie. Algumas *Brucella* spp. são zoonóticas para seres humanos e amplamente distribuídas no mundo (Bargen et al. 2012). Segundo o Comitê Internacional em Taxonomia Bacteriana (2013), o gênero possui seis espécies consideradas clássicas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*. Esta classificação baseia-se, principalmente, nas diferenças patogênicas, na preferência por hospedeiros e nas características fenotípicas. Foram, também,

incluídas no gênero, as espécies marinhas *B. ceti* e *B. pinnipedialis* e as espécies *B. microti* e *B. inopinata*.

B. suis possui cinco biovars, sendo que o 1, 2 e 3 acomete preferencialmente suínos (Di Febo et al. 2012). Quando o animal é infectado a bactéria atravessa as mucosas do trato respiratório, digestivo ou genital, sofre fagocitose e atinge os linfonodos locais (Bargen et al. 2012). Nos suínos ocorre bacteremia intermitente por várias semanas. A bactéria instala-se principalmente nos gânglios mandibulares, gastro-hepáticos, ílaicos interno e retrofaringeos, além do fígado, rins, articulações e órgãos reprodutivos (Deyoe & Manthei 1967). Dentre os sinais clínicos estão o aborto e infertilidade nas fêmeas e orquite nos machos, podendo ocorrer artrites, laminites e abscessos de diferentes tamanhos em órgãos e tecidos (Megid et al. 2010).

A linfadenite em suínos é uma das principais afecções de suínos no Brasil e acarreta alto prejuízo econômico por condenação de vísceras e carcaças com destino condicionado (Amaral et al. 2004).

B. abortus e *B. melitensis* podem infectar suínos, ainda que o mais comum seja encontrar o agente de acordo com o hospedeiro de eleição (OIE 2009).

O diagnóstico “padrão ouro” da brucelose é o isolamento bacteriológico. A OIE (2009) orienta o uso simultâneo do meio seletivo suplementado com Farrell e o meio Thayer-Martin modificado para o isolamento primário de *Brucella* de amostras veterinárias. O meio seletivo Agar *Brucella* suplementado com Farrell (Farrell) é o que mais inibe o crescimento de contaminantes e, provavelmente, o mais usado para o diagnóstico bacteriológico em laboratórios no mundo. Porém alguns antibióticos que contém em sua formulação inibem e dificultam o crescimento de algumas espécies de *Brucella*. O meio Thayer-Martin modificado melhora a sensibilidade do Farrell, entretanto, é menos inibidor de micro-organismos contaminantes. Por esse motivo, o meio CITA foi criado com base no Thayer-Martin modificado, com o diferencial nas concentrações de antibióticos e na adição de anfotericina B para inibição de contaminantes sem inibir o crescimento de *Brucella* spp. (De Miguel et al. 2011). O meio Agar *Brucella* é muito utilizado nos laboratórios de diagnóstico de brucelose no Brasil, como Meirelles-Bartoli et al. (2012) que utilizaram este meio para o isolamento de *B. suis* em um surto.

Em suínos infectados vivos, a brucela pode ser isolada de descargas vaginais, placenta, feto e sêmen. Após a necropsia pode-se isolar de linfonodos, fígado, baço, glândulas mamárias, epidídimo e próstata (De Miguel et al. 2011).

Neste trabalho objetivou-se avaliar os meios de cultura Agar *Brucella*, Farrell e CITA, e investigar a presença de *Brucella* spp. por cultivo microbiológico em linfonodos de suínos e javalis com linfadenite, oriundos de abatedouros do interior do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do Ágar *Brucella* foi utilizado o *Brucella* Medium Base (OXOID) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Invitrogen). Este mesmo meio também foi suplementado com Farrell (OXOID) e 5% de soro fetal bovino. O meio CITA foi realizado com Blood Agar Base nº2 (OXOID) suplementado com os seguintes antibióticos: vancomicina (Sigma), colistina (Sigma), nistatina (Sigma), nitrofurantoina (Sigma) e anfotericina B (Sigma), e 5% de soro fetal bovino. As proporções de antibióticos utilizados foi seguida de acordo com De Miguel et al. (2011). Como controle positivo microbiológico, para a avaliação dos meios de cultura, foi utilizado linfonodos de suínos contaminados com *B. canis*, *B. ovis*, *B. abortus*, *B. abortus B19* e *B. abortus Rb51*. Linfonodos de suínos sabidamente negativos foram macerados na diluição de 1:10 com solução salina tamponada para a contaminação com as diferentes amostras de *Brucella*. Foi utilizado 180µl do linfonodo macerado com 20µl da solução contendo a bactéria por placa que foi distribuída de forma uniforme com alça de drigalski. Para a contaminação as espécies *Brucella canis*, *Brucella ovis* e *Brucella abortus* foram diluídas na escala 1 de Mcfarland e as concentrações iniciais de *B. abortus B19* (Biovet) e *B. abortus Rb51* (Intervet – Shering plough animal health) foram as diluições recomendadas para as vacinas utilizadas. As concentrações iniciais foram diluídas a 1:10 com TE buffer para a contaminação dos linfonodos. Adicionalmente, foram colhidos 100 linfonodos, sendo 50 de suínos e 50 javalis, com linfadenite, em abatedouros do estado de São Paulo. No laboratório esses linfonodos também foram macerados na diluição de 1:10 com solução salina estéril para análise microbiológica. Para esta análise foram utilizados três meios de cultura diferentes: Ágar *Brucella*, Ágar *Brucella* suplementado com Farrell e meio CITA. Tanto para os controles quanto para as amostras, foram utilizadas duas placas por meio, sendo uma mantida a 37°C em condições normais de atmosfera e a outra a 37°C com adição de CO₂ a 10% em alta umidade. As placas foram

observadas diariamente e consideradas negativas quando não houve crescimento microbiológico até o 14º dia. As colônias nas placas foram avaliadas por meio de morfologia, período de crescimento e coloração de Gram.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No meio Agar *Brucella*, nas 10 placas analisadas por linfonodos de suínos, sabidamente negativos, contaminados com *B. canis*, *B. ovis*, *B. abortus*, *B. abortus* B19 e *B. abortus* Rb51 observou-se o crescimento bacteriano de todas as espécies porém em 6 placas também ocorreu crescimento fúngico demonstrando a ausência de inibição de contaminantes. Dentre as 100 amostras analisadas (200 placas), houve 70 placas com crescimento fúngico no meio Agar *Brucella*, sendo 39 de suínos e 31 de javalis. O crescimento destes micro-organismos se dá pela ausência de antibióticos inibidores como, por exemplo, Cicloheximida, presente no suplemento de Farrell que inibe a tradução do mRNA pelos ribossomos, prevenindo a síntese proteica do fungo (De Miguel et al. 2011). O crescimento fúngico pode também inibir o crescimento bacteriano, levando à redução da sensibilidade do diagnóstico bacteriológico (Marín et al. 1996). Portanto, não é recomendado o uso de meio de cultura não seletivo para o isolamento de *Brucella* spp. de materiais contaminados. Neste mesmo meio, houve crescimento bacteriano em 29 amostras de suínos (sendo 6 com CO₂, 6 sem CO₂ e 17 em ambas as condições de cultivo) e em 30 placas de amostras de javali (sendo 5 com CO₂, 7 sem CO₂ e 18 em ambas as condições de cultivo). Destas bactérias cultivadas foi realizado o teste de coloração de Gram, onde todas as amostras resultaram Gram-positivas.

Os controles de *Brucella* também cresceram adequadamente no meio CITA, porém neste meio não ocorreu crescimento de fungos. O mesmo ocorreu nas amostras de campo, isto se justifica pela adição do antibiótico anfotericina B que interage com um esteroide presente na membrana do fungo que resulta na perda da permeabilidade seletiva da membrana e componentes citoplasmáticos (De Miguel et al. 2011). Das placas com material de linfonodos, em 11 placas de suínos (2 com CO₂, 3 sem CO₂ e 6 em ambas as condições de cultivo) e em 4 placas de javalis (3 com CO₂ e 1 sem CO₂) houve crescimento bacteriano resultando Gram-positivas. Os antibióticos presentes nesse meio não inibem o crescimento de bactérias, com exceção de espécies de *Mycoplasma* (De Miguel et al. 2011).

No meio Farrell dos controles avaliados somente o crescimento de *B. ovis* foi inibido sendo observado o crescimento das demais espécies de *Brucella* e ausência de contaminantes nas placas. Não houve crescimento bacteriano e tampouco fúngico em nenhuma das placas cultivadas com material procedente de linfonodos de suínos e javalis. Este meio, pelas concentrações de antibióticos presentes, impede o crescimento de fungos e bactérias comensais frequente em contaminação do ambiente de coleta, e de bactérias gram-positivas como ocorreu no meio ágar *Brucella* e CITA. Este é o meio que melhor inibe o crescimento de contaminantes, entretanto, alguns antibióticos que contém em sua formulação são também altos inibidores de crescimento de *B. ovis* e dificultam o crescimento de *B. melitensis*, *B. suis* e algumas cepas de *B. abortus* (Ferrão-Beck et al. 2006). No caso de *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* a inibição é devido, principalmente, a altas concentrações de ácido nalidixico e bacitracina (Marín et al. 1996, Ferrão-Beck et al. 2006). Os micro-organismos mais encontrados como contaminantes em amostras veterinárias são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus* spp. (De Miguel et al. 2011).

Mesmo não tendo sido isolada a *Brucella* nos linfonodos de suínos e javalis, aqui avaliados, há muitos relatos de soropositividade em suínos desta enfermidade no Brasil, como relatado por Jesus et al. (2010), Borges et al. (2011) e Rosa et al. (2012). A presença de animais reagentes é preocupante, portanto é de extrema importância o controle da doença nas diferentes fases da cadeia produtiva, desde a criação e abate dos animais, onde há risco de infecção de humanos pelo contato com animal e manuseio das carcaças, até a venda da carne podendo o consumidor ingerir um alimento de qualidade sanitária suspeita.

CONCLUSÃO

O uso simultâneo dos meios CITA e Farrell apresentou melhor resultado para o isolamento da *Brucella*. Não foi detectada a presença de *Brucella* spp. nos linfonodos de suínos e javalis avaliados.

REFERÊNCIAS

- Amaral A.L., Morés N., Barioni W.J., Ventura L., Silva R.A.M. & Silva V.S. 2004. Fatores de risco associados à ocorrência de linfadenite em suínos na fase de crescimento-terminação. *Pesq. Vet. Bras.* 24(3):120-122.
- Bargen K., Gorvel J.P. & Salcedo S.P. 2012. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS. Microbiol. Res.* 36(3):533-562.
- Borges S.R.T., Souza L.C., Silva R.C. & Almeida E. 2011. Avaliação dos níveis de biossegurança das granjas de reprodutores suínos certificadas no estado de São Paulo, Brasil. *Vet. e Zootec.* 18:417-431.
- De Miguel M.J., Marín C.M., Muñoz P.M., Dieste L., Grilló M.J. & Blasco J.M. 2011. Development of a selective culture médium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.* 49(4):1458-1463.
- Deyoe B.L. & Manthei C.A. 1967. Sites os location of *Brucella suis* in swine. *Proc. Annu. Met US Livest. Sant. Assoc.*, 71:102-108.
- Di Febo T., Luciani M., Portanti O., Bonfini B., Lelli R. & Tittarelli M. 2012. Development and evaluation of diagnostic tests for the serological diagnosis of brucellosis in swine. *Vet. Ital.* 48(2):133-156.
- Ferrão-Beck L., Cardoso R., Muñoz P.M., De Miguel M.J., Albert I., Ferreira A.C., Marín C.M., Thiébaud M., Jacques I., Grayon M., Zygmunt M.S., Garin-Bastuji B., Blasco J.M. & Sá M.I. 2006. Development of a multiplex PCR assay for polymorphism analysis of *Brucella suis* biovars causing brucellosis in swine. *Vet. Microbiol.* 115:269-277.
- Jesus V.L.T., Pereira R.C.G., Meirelles G.S., Rodrigues J.S., Jorge J.L.B.P. & Flaúsino W. 2010. Brucelose suína no estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med. Vet.* 32:101-104.
- International Committee on Bacterial Taxonomy. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*, 2013. Disponível em: <<http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>>. Acesso em: 20 mar. de 2013.
- Marín C.M., Alabart J.L. & Blasco J.M. 1996. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.* 34(2):426-428.
- Megid J., Mathias L.A. & Robles C.A. 2010. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *Open Vet. Sci. J.* 4:119-126.
- Meirelles-Bartoli R.B., Mathias L.A. & Samartino L.E. 2012. Brucellosis due to *Brucella suis* in a swine herd associated with a human clinical case in the State of São Paulo, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 44(7):1575-9.
- OIE. 2009. Porcine Brucellosis. NB: Version adapted by the World Assembly of Delegates of the Office International des epizooties, Paris, France.
- Rosa D.C., Gargia K.C.O.D. & Megid J. 2012. Soropositividade para brucelose em suínos em abatedouros. *Pesq. Vet. Bras.* 32:623-626.

CAPITULO 4

DISCUSSÃO GERAL

A brucelose é uma das zoonoses que mais acomete humanos no mundo. Para o controle da enfermidade no homem deve-se controlar a enfermidade nos animais (BARGEN et al., 2012).

O isolamento da bactéria é o diagnóstico padrão ouro (OIE, 2009). Analisando os resultados obtidos no estudo, é de extrema importância a utilização de um meio de cultura seletivo para o isolamento primário de *Brucella* spp. Com a utilização de um meio que iniba o crescimento de fungos e bactérias comensais ocorre o aumento da sensibilidade do teste, aumento a probabilidade de isolamento da bactéria de amostras veterinária de campo (DE MIGUEL et al., 2011).

Os programas de controle e erradicação da doença são baseados nos testes diagnósticos sorológicos. Os testes sorológicos recomendados pelo MAPA, no Brasil, diferem dos indicados pelo Escritório Internacional de Saúde Animal (OIE) e impedem uma correta avaliação da situação sanitária em suínos. Existe a necessidade de reavaliação das normas para diagnóstico da brucelose suína em nosso país visto a discrepância dos resultados nos estudos sorológicos avaliados.

Apesar dos relatos de animais soropositivos, não encontramos a bactéria nos linfonodos analisados no estudo, o que pode ser decorrente do pequeno número de amostras avaliadas. No entanto o trabalho permitiu a avaliação do cultivo microbiológico utilizando diferentes meios a partir de materiais experimentalmente infectados. Os resultados demonstraram a necessidade de associação dos meios de cultura Farrell e CITA para um resultado mais confiável.

CONCLUSÕES GERAIS

1 - O uso simultâneo do meio CITA e Farrell demonstrou bons resultados para o isolamento das diferentes espécies de *Brucella* em linfonodos de suínos experimentalmente contaminados.

2 - Não foram encontradas amostras positivas para *Brucella* spp. com as diferentes técnicas utilizadas em linfonodos de suínos e javalis, com linfadenite, abatidos nos frigoríficos do interior do estado de São Paulo.

3 – Há necessidade de reavaliação das técnicas para o diagnóstico sorológico da brucelose suína no país de forma a seguir as normas da OIE.

BIBLIOGRAFIA

ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 16 de março de 2013.

AMARAL, A. L.; MORÉS, N.; BARIONI, W. J.; VENTURA, L.; SILVA, R. A. M.; SILVA, V. S. Fatores de risco associados à ocorrência de linfadenite em suínos na fase de crescimento-terminação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, n.3, p.120-122, 2004.

AZEVEDO, S. S.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, M. L. C. R.; MACEDO, M. M. S.; SANTOS, C. S. A. B.; ALVES, C. J.; HIGINO, S. S. S. Anticorpos contra brucelas lisas em suínos abatidos no semiárido da Paraíba. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.79, p.97-99, 2012.

BARGEN, K.; GORVEL, J. P.; SALCEDO, S. P. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS. Microbiology Reviews*, n.36, p.533-562, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Instrução Normativa n° 19, de 19 de fevereiro de 2002. Aprova as normas a serem cumpridas para certificação de granjas de reprodutores suídeos. *Diário Oficial República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de março de 2002. p.3-4.

BROWN, G. M., RANGER, C. R., KELLEY, D. J. Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *Cornell Veterinarian*, v.61, p.265-280, 1971.

DE MIGUEL, M. J.; MARÍN, C. M.; MUÑOZ, P. M.; DIESTE, L.; GRILLÓ, M. J.; BLASCO, J. M. Development of a selective culture médium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v.49, n.4, p. 1458-1463, 2011.

DEBERDT, A. J.; SCHERER, S. B. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. *Natureza & Conservação*, v.5, n.2, p.31-44, 2007.

DI FEBBO, T.; LUCIANI, M.; PORTANTI, O.; BONFINI, B.; LELLI, R.; TITTARELLI, M. Development and evaluation of diagnostic tests for the serological diagnosis of brucellosis in swine. *Veterinaria Italiana*, v.48, p.145-156, 2012.

FARRELL, I. D. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus*. *Research in Veterinary Science*, v.16, p.280-286, 1974.

FREITAS, J. A.; GALINDO, G. A. R.; SANTOS, E. J. C.; SARRAF, K. A.; OLIVEIRA, J. P. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. *Revista Saúde Pública*, v.35, p.101-102, 2001.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY. SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF BRUCELLA, 2013. Disponível em: <<http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm> >. Acesso em: 20 de março de 2013.

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

JONES, L. M.; MORGAN, W. J. B. A preliminary report on a selective medium for the culture of *Brucella*, including fastidious types. *Bulletin of the World Health Organization*, v.19, n.1, p.200-203, 1958.

KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, p.65-78, 2003.

KUZDAS, C. D.; MORSE, E. V. A selective medium for the isolation of *Brucellae* from contaminated materials. *Journal of Bacteriology*, v.66, p.502-504, 1953.

LARA, G.H.B. Ocorrência de *Mycobacterium* spp. e outros microorganismos em linfonodos de suínos e javalis de abatedouro, com e sem linfadenite. Botucatu, 2009. 70f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

MATHIAS, L. A. Brucelose animal e suas implicações em saúde pública. *Biológico*, v.70, p.47-48, 2008.

MARÍN, C. M.; ALABART, J. L.; BLASCO, J. M. effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.2, p.426-428, 1996.

MEGID, J.; MATHIAS, L. A.; ROBLES, C. A. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *The Open Veterinary Science Journal*, v.4, p.119-126, 2010.

MENG, X. J.; LINDSAY, D. S.; SRIRANGANATHAN, N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science*, v.364, p.2697-2707, 2009.

MORRIS, E. J. A selective medium for *Brucella* spp. *Journal of General Microbiology*, v.15, p.629-631, 1956.

MUÑOZ, P. M.; BLASCO, J. M.; ENGEL, B.; DE MIGUEL, M. J.; MARÍN, C. M.; DIESTE, L.; MAINAR-JAIME, R. Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v.146, p.150-158, 2012.

OLIVEIRA, S. J.; BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; RAMOS, E. T. Etiologia de lesões tuberculóides em suínos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.23, p.112-116, 1995.

OIE. Porcine Brucellosis. *OIE Terrestrial Manual*, p.1-7, 2009. World Organization for Animal Health, Paris, France, 2009.

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

RIBEIRO, T. C. F. S.; MOTA, R. A.; COSTA, A. N.; LIMA, E. T.; CASTRO JÚNIOR I. F. Inquérito soropidemiológico da brucelose suína em granjas

comerciais da Zona de Mata de Pernambuco. *Ciência Animal*, v.11, p.65-71, 2001.

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

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

SILVA, M. A.; SOUZA, L. C. A.; SANTANA, F. C. et al. Inquérito soropidemiológico da infecção por *Brucella* spp. em granjas suinícolas tecnificadas no estado de Alagoas. In: VI Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. Anais... Maringá, 2009.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; HARTIGH, A. B.; TSOLIS, R. M.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, v.4, p.109-118, 2010.

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