

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia

Nº 47 - Páginas 1 a 110 - Abril 2005

Brucelose
Bovina

Diagnóstico
da Brucelose
Bovina

Controle
da Brucelose
Bovina

Brucelose
Suína

Brucelose
Canina

Infecção por
Brucella ovis

Brucelose:
zoonose
e
terrorismo

Programa
Nacional
Controle de
Eradicação da
Brucelose e
Tuberculose





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia
FEP-MVZ Editora
CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS
CRMV-MG

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia
n. 47

Abril de 2005

Editor: Prof. Humberto P Oliveira
FEP-MVZ Editora
Caixa Postal 567
30123-970 Belo Horizonte, MG
Telefone (31) 3499-2042
Fax (31) 3499-2041
0055 31 3499-2041
E-mail: journal@vet.ufmg.br

Belo Horizonte
2005

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia
Edição da FEP-MVZ Editora em convênio com o
CRMV-MG

Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina
Veterinária e Zootecnia – FEP MVZ
Diretor Executivo: Roberto Baracat de Araújo
Vice-Diretor Executivo: Francisco Carlos Faria
Lobato
Editor da FEP MVZ Editora: Martinho de Almeida e
Silva

Conselho Regional de Medicina Veterinária do
Estado de Minas Gerais - CRMV-MG
Presidente: Marcílio Magalhães Vaz de Oliveira
Vice-Presidente: Ismael Fernando Prado Coimbra
Secretário Geral: Edian Fontes Bastos
Tesoureira: Silvana de Vasconcelos Cançado
E-mail: crmvmg@crmvmg.org.br

Corpo Editorial
Editor: Humberto P. Oliveira, Med. Vet., Dr.
Iran Borges, Zootecnista, Dr.
Marília Martins Melo, Med. Vet., Dr.
Paulo Roberto Oliveira, Med. Vet., Dr.

Revisão e edição de texto: Humberto P. Oliveira.

Tiragem desta Edição
6500 exemplares

NORMAS PARA OS AUTORES

O periódico técnico-científico *CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA*, ex-Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG é editado, a partir do número 24, pela FEP MVZ Editora, em Convênio com o Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais. Publica assuntos de interesse imediato para estudantes e profissionais oriundos da produção técnica e didática de professores, alunos, pesquisadores e outros profissionais de ciências agrárias, a critério do Corpo Editorial.

Engloba congressos, seminários, cursos, palestras e revisões nas áreas de Medicina Veterinária, Produção Animal, Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Ensino e Sociologia, Economia e Extensão Rurais. Cada matéria é rigorosamente revisada tanto no aspecto formal quanto no de conteúdo e, além disso, é tratada, tanto quanto possível, de forma concisa, acessível e agradável, sem prejuízo do rigor científico.

As matérias submetidas à publicação devem ser inéditas, corrigidas por revisor de português e enviadas para o Editor em cópia impressa e em disquete com arquivo compatível com Word for Windows ou por E-mail. Aquelas aceitas pelo Corpo Editorial passam à propriedade da Editora e as não aceitas ficam à disposição dos autores. Cada autor recebe cinco exemplares dos *Cadernos* em que o artigo foi publicado. Os artigos publicados não são remunerados e não se aceita matéria paga.

À FEP MVZ Editora são reservados todos os direitos, inclusive os de tradução. Os trabalhos publicados terão seus direitos autorais resguardados pela FEP MVZ Editora que, em quaisquer circunstâncias, agirá como legítima detentora dos mesmos.

**Permite-se a reprodução total
ou parcial, sem consulta prévia,
desde que seja citada a fonte.**

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG)
N.1- 1986 - Belo Horizonte, Centro de Extensão da Escola de Veterinária da UFMG, 1986-1998.
N.24-28 1998-1999 - Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1998-1999
v. ilustr. 23cm
N.29- 1999- Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1999.
Periodicidade irregular.

1. Medicina Veterinária – Periódicos. 2. Produção Animal – Periódicos. 3. Produtos de Origem Animal, Tecnologia e Inspeção – Periódicos. 4. Extensão Rural – Periódicos. I. FEP MVZ Editora, ed.

APRESENTAÇÃO

Os *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, editados pela Fundação de Estudo e Pesquisa da Medicina Veterinária e Zootecnia – FEPMVZ, em convênio com o Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais - CRMV-MG, constituem importante meio de disseminação do conhecimento. Fazem parte do “Projeto de Educação Continuada” do CRMV-MG, que visa levar atualização científica aos profissionais.

Os médicos veterinários e os zootecnistas têm sempre a oportunidade de se atualizarem sobre os diversos temas profissionais abordados nos *Cadernos*. Nesta edição, por se tratar de assunto relevante para a sanidade animal e saúde pública, a brucelose é enfocada nas diferentes espécies domésticas.

No momento em que o Brasil se destaca como o maior exportador mundial de carne bovina e que supera seus recordes de produção de leite e de carne suína, angariando para o agronegócio resultados favoráveis, cabe aos veterinários contribuir para a erradicação total da brucelose, por ser uma questão de saúde pública e para evitar que esta seja utilizada como justificativa ou como barreira ao comércio brasileiro de proteína animal, principalmente de carne bovina.

Marcílio Magalhães Vaz de Oliveira
CRMV-MG nº 1117
Presidente

Prof. Roberto Baracat de Araújo
FEP MVZ
Diretor Executivo

Prof. Humberto P. Oliveira
FEP MVZ Editora
Cad. Téc. Vet. Zootec.
Editor

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia
Edição da FEP-MVZ Editora em convênio com o
CRMV-MG

Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina
Veterinária e Zootecnia - FEP MVZ
Diretor Executivo: Roberto Baracat de Araújo
Vice-Diretor Executivo: Francisco Carlos Faria
Lobato
Editor da FEP MVZ: Editora: Martinho de Almeida e
Silva

Conselho Regional de Medicina Veterinária do
Estado de Minas Gerais - CRMV-MG
Presidente: Marcílio Magalhães Vaz de Oliveira
Vice-Presidente: Ismael Fernando Prado Coimbra
Secretário Geral: Edian Fontes Bastos
Tesoureira: Silvana de Vasconcelos Cançado
E-mail: crmvmg@crmvmg.org.br

Corpo Editorial
Editor: Humberto P. Oliveira, Med. Vet., Dr.
Iran Borges, Zootecnista, Dr.
Marília Martins Melo, Med. Vet., Dr.
Paulo Roberto Oliveira, Med. Vet., Dr.

Revisão e edição de texto: Humberto P. Oliveira.

Tiragem desta Edição
6500 exemplares

NORMAS PARA OS AUTORES

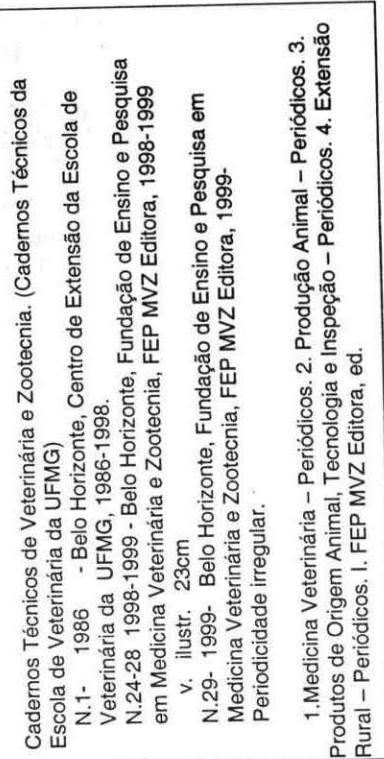
O periódico técnico-científico *CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA*, ex-Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG é editado, a partir do número 24, pela FEP MVZ Editora, em Convênio com o Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais. Publica assuntos de interesse imediato para estudantes e profissionais oriundos da produção técnica e didática de professores, alunos, pesquisadores e outros profissionais de ciências agrárias, a critério do Corpo Editorial.

Engloba congressos, seminários, cursos, palestras e revisões nas áreas de Medicina Veterinária, Produção Animal, Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Ensino e Sociologia, Economia e Extensão Rurais. Cada matéria é rigorosamente revisada tanto no aspecto formal quanto no de conteúdo e, além disso, é tratada, tanto quanto possível, de forma concisa, acessível e agradável, sem prejuízo do rigor científico.

As matérias submetidas à publicação devem ser inéditas, corrigidas por revisor de português e enviadas para o Editor em cópia impressa e em disquete com arquivo compatível com Word for Windows ou por E-mail. Aquelas aceitas pelo Corpo Editorial passam à propriedade da Editora e as não aceitas ficam à disposição dos autores. Cada autor recebe cinco exemplares dos *Cadernos* em que o artigo foi publicado. Os artigos publicados não são remunerados e não se aceita matéria paga.

À FEP MVZ Editora são reservados todos os direitos, inclusive os de tradução. Os trabalhos publicados terão seus direitos autorais resguardados pela FEP MVZ Editora que, em quaisquer circunstâncias, agirá como legítima detentora dos mesmos.

**Permite-se a reprodução total
ou parcial, sem consulta prévia,
desde que seja citada a fonte.**



APRESENTAÇÃO

Os *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, editados pela Fundação de Estudo e Pesquisa da Medicina Veterinária e Zootecnia – FEPMVZ, em convênio com o Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais - CRMV-MG, constituem importante meio de disseminação do conhecimento. Fazem parte do ‘Projeto de Educação Continuada’ do CRMV-MG, que visa levar atualização científica aos profissionais.

Os médicos veterinários e os zootecnistas têm sempre a oportunidade de se atualizarem sobre os diversos temas profissionais abordados nos *Cadernos*. Nesta edição, por se tratar de assunto relevante para a sanidade animal e saúde pública, a brucelose é enfocada nas diferentes espécies domésticas.

No momento em que o Brasil se destaca como o maior exportador mundial de carne bovina e que supera seus recordes de produção de leite e de carne suína, angariando para o agronegócio resultados favoráveis, cabe aos veterinários contribuir para a erradicação total da brucelose, por ser uma questão de saúde pública e para evitar que esta seja utilizada como justificativa ou como barreira ao comércio brasileiro de proteína animal, principalmente de carne bovina.

Marcílio Magalhães Vaz de Oliveira
CRMV-MG nº 1117
Presidente

Prof. Roberto Baracat de Araújo
FEP MVZ
Diretor Executivo

Prof. Humberto P. Oliveira
FEP MVZ Editora
Cad. Téc. Vet. Zootec.
Editor

CONTEÚDO

Brucelose Bovina	
Diagnóstico da Brucelose Bovina	1
Controle da Brucelose Bovina	13
Infecção por <i>Brucella ovis</i>	30
Brucelose Suína	42
Brucelose Canina	57
Brucelose: zoonose e bioterrorismo	66
Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (Pncebta)	83
	99

outros fatores antibacterianos. Outra célula alvo da *B. abortus* é o trofoblasto, que é a principal célula da porção fetal da placenta.

No trofoblasto, a *B. abortus* encontra condições excepcionalmente favoráveis à sua replicação, levando a placentite, aborto e disseminação do agente entre outros animais do rebanho. Estes mecanismos foram recentemente detalhados nas revisões de Ficht (2003), Ko & Splitter (2003) e Gorvel & Moreno (2002). Nas seções abaixo são discutidos alguns aspectos relevantes sob o ponto de vista médico veterinário da patogênese e patologia da infecção por *B. abortus*.

BRUCELOSE BOVINA

Fabiana Lessa Silva¹
Tatiane Alves da Paixão²
Álan Maia Borges³
Andrey Pereira Lage³
Renato de Lima Santos³

1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é causada pela *Brucella abortus*, que ao longo de sua evolução desenvolveu mecanismos para conviver com seus hospedeiros, particularmente os bovinos, de tal forma que se tornasse possível sua sobrevivência no organismo do hospedeiro por períodos prolongados, favorecendo a permanência e a transmissão do patógeno na população. Um dos aspectos mais importantes desse processo é a capacidade de *B. abortus* de sobreviver e se multiplicar no interior de células especializadas em destruir agentes invasores, sendo o melhor exemplo os macrófagos. Portanto, a *B. abortus* é capaz de interferir com a função bactericida do macrófago, ao mesmo tempo em que ela cria para si mesma um ambiente protegido, livre dos “perigos” da vida extracelular no organismo do hospedeiro, onde estão presentes anticorpos, complemento, entre

2. PATOGENICIDADE

2.1. Vias de infecção e disseminação

A via mais comum de infecção por *Brucella abortus* é o trato gastrintestinal (Ackermann et al., 1988; Ko & Splitter, 2003). Após a ingestão as bactérias são endocitadas pelas células epiteliais do intestino delgado (Ackermann et al., 1988), particularmente as células M das placas de Peyer (a estrutura da placa de Peyer bovina foi descrita em detalhes por Parsons et al., 1991), e se alojam inicialmente nos linfonodos regionais, onde proliferam no interior de fagócitos (Anderson et al., 1986a;). A invasão dos vasos linfáticos e a bacteremia subsequentes permitem a disseminação da infecção por todo o organismo e, consequentemente, a colonização de vários tecidos, especialmente os órgãos genitais masculinos, útero gestante e glândulas mamárias.

A *B. abortus* também pode ser encontrada no baço, fígado, linfonodos, ossos e

¹Escola de Veterinária da UFMG, C. Postal 567. - 31123-970 Belo Horizonte, MG
²Méd.Vet., MMV, Doutoranda
³Méd.Vet., Mestranda
Méd.Vet., PhD, Prof. Adjunto.
rsantos@vet.ufmg.br

articulações. A inalação também tem sido descrita como importante via de infecção (Ko & Splitter, 2003). Descreve-se também a penetração de bactérias pela pele, conjuntiva e mucosas. As principais fontes de infecção são fetos abortados, placenta, anexos fetais e descargas uterinas contaminadas, que são eliminadas após aborto ou no período pós-parto (Fig.1).

Os touros geralmente não transmitem a infecção pela monta natural, porém a inseminação artificial utilizando sêmen contaminado pode infectar as vacas receptoras. O cuidado com avaliação do sêmen é importante, pois touros podem ser sorologicamente negativos e eliminarem *B. abortus* no plasma seminal (Lambert et al., 1963; Rankin, 1965).

Em vacas gestantes, a infecção fetal ocorre após a multiplicação de *B. abortus* nas células trofoblásticas, que leva à necrose do trofoblasto, vasculite, separação da placenta fetal da materna e ulceração da membrana cório-alantóidea. Posteriormente, a bactéria se dissemina para as vilosidades coriônicas, tecidos fetais e lume uterino (Anderson et al., 1986a).

2.2. Interção entre *Brucella abortus* e o trofoblasto

A *B. abortus* possui grande afinidade pela placenta de ruminantes, o que leva à ocorrência de placentite e consequentemente abortos, principalmente no terço final da gestação (Anderson et al., 1986a). Na placenta os microorganismos replicam com grande avidez no meio intracelular de células do epitélio trofoblástico, o que é responsável pela

grande quantidade de *B. abortus* nesse tecido (Anderson et al., 1986a,b; Meador & Doyoe, 1989). A afinidade de *B. abortus* pelo trofoblasto de ruminantes parece estar relacionada à presença de elevadas concentrações de eritritol e progesterona na placenta. *B. abortus* é um dos poucos organismos que têm capacidade de utilizar o eritritol como fonte de carbono e energia (Samartino & Enright, 1993). Tanto o eritritol quanto a progesterona colabora para o crescimento *in vitro* de *B. abortus* (Anderson et al., 1986a,b). Samartino & Enright (1996) demonstraram que *B. abortus* cresce preferencialmente no trofoblasto do final da gestação (180 a 240 dias). Células trofoblásticas do inicio da gestação (60 a 120 dias) praticamente não permitem o crescimento intracelular da bactéria. Estes dados correlacionam bem com a manifestação clínica da infecção, ou seja, aborto preferencialmente no terço final da gestação.

A vaca tem placenta do tipo cotiledonária, na qual as unidades placentárias, chamadas de placentomas, são restritas às áreas em que o alantocório tem interação com as carúnculas e, consequentemente, há a formação dos cotilédones, cujas vilosidades coriônicas penetram nas criptas carunculares (Santos & Marques Júnior, 1996). Acreditava-se que, após a ocorrência de bacteremia, a *B. abortus* proveniente da circulação sanguínea materna infectava inicialmente as células do trofoblasto eritrofagocítario (localizados nos cotilédones), com posterior extensão para o trofoblasto intercotiledonário (Anderson et al., 1986a). Dessa forma, as células trofoblásticas representam o sítio primário de entrada e replicação de *B. abortus* na placenta (Anderson et al., 1986a). Após a penetração nas células do

trofoblasto, as bactérias iniciam o processo de replicação no interior de cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Anderson et al., 1986b). Posteriormente, as células do trofoblasto cório-alantóideo sofrem necrose levando à ulcerações da membrana cório-alantóidea e liberação de grande número de bactérias que então infectam os tecidos fetais (Anderson et al., 1986b). Estas alterações placentárias e fetais vão culminar com a ocorrência de aborto, que tem grande importância para a transmissão da doença, uma vez que os produtos do aborto, incluindo-se o feto, a placenta e as secreções uterinas eliminadas por vários dias após a expulsão do feto, representam a principal fonte de infecção para os outros animais do rebanho.

2.3. Mecanismos de invasão e sobrevivência nas células do hospedeiro

Bactérias do gênero *Brucella* são classicamente classificadas como parasitas intracelulares facultativos. Entretanto, alguns autores consideram que a melhor classificação seria a de parasitas intracelulares facultativamente extracelulares devido à preferência desses microorganismos pelo meio intracelular (Gorvel & Moreno, 2002). Contrariamente a outras bactérias patogênicas, fatores clássicos de virulência como exotoxinas, flagelos, fímbrias, cápsulas e outros não são encontrados em *Brucella* sp. Os fatores envolvidos com a patogenicidade são aqueles que permitem a invasão, a sobrevivência e a multiplicação intracelular nas células do hospedeiro (Gorvel & Moreno, 2002).

Brucella sp. pode infectar fagócitos e células não fagocíticas *in vivo* e *in vitro*

(Detilleux et al., 1990a,b; Pizarro-Cerdá et al., 1998). Após invadir as mucosas, bactérias opsonizadas e não opsonizadas são internalizadas por fagócitos localizados na submucosa. Quando *B. abortus* sofre opsonização e é fagocitada por macrófagos ativados, ela se torna mais suscetível aos mecanismos bactericidas dos macrófagos. Em macrófagos ativados, a maioria das bactérias internalizadas é destruída no interior de fagolisossomos antes de atingir os sítios de replicação intracelulares, após resistir por um curto período de tempo aos mecanismos microbicidas dessas células (Gorvel & Moreno, 2002). Ao contrário do que ocorre nos macrófagos, *B. abortus* não replica dentro de neutrófilos (Gorvel & Moreno, 2002).

Apesar de não terem sido reconhecidos ligantes na superfície de *Brucella* sp. e receptores celulares específicos em células não fagocíticas, há indícios que apontam para a existência de moléculas específicas que determinariam a ligação de bactérias às células do hospedeiro (Gorvel & Moreno, 2002). A internalização das bactérias por células não fagocíticas envolve a participação do citoesqueleto de actina e de microtúbulos (Guzmán-Verri et al., 2001). Apesar das formas rugosas de *Brucella* sp. fixarem-se com melhor eficiência às células do hospedeiro, as formas lisas são mais eficientes no processo de invasão, indicando um papel importante do polissacárido O e das moléculas associadas na invasibilidade de *Brucella* sp. (Detilleux et al., 1990a,b).

Uma vez no interior das células do hospedeiro, as cepas virulentas de *B. abortus* alteram a dinâmica normal de maturação do fagossomo, bloqueando sua fusão com os endossomos e lisossomos,

6 AGO 2005

VETERINÁRIA DA UFSC

impedindo que ocorra degradação bacteriana e possibilitando sua localização nos sítios intracelulares de replicação (Gorvel & Moreno, 2002). Conforme ilustrado na Fig. 2, nos estágios iniciais da infecção, as bactérias podem ser encontradas no interior de vacúolos com características semelhantes a autofagossomos. Posteriormente, as formas virulentas de *B. abortus* transitam em direção às cisternas do retículo endoplasmático rugoso, onde ocorre intensa replicação (Anderson et al., 1986b; Pizarro-Cerdá et al., 1998). A infecção por *B. abortus* inibe a fusão entre o fagossomo e o lisossomo, tanto em células fagocíticas quanto em células não fagocíticas. Estudos iniciais demonstraram que extratos solúveis de *B. abortus* interferiam com a maturação do fagossomo (Frenchick et al., 1985). Mais recentemente foi descoberto um sistema de secreção tipo IV, semelhante ao encontrado em patógenos de plantas como o *Agrobacterium tumefaciens*, que está envolvido com a regulação do trânsito das formas virulentas de *B. abortus* entre os vacúolos semelhantes a autofagossomos e as cisternas do retículo endoplasmático rugoso, sendo considerado como importante fator de virulência (Boschirolí et al., 2002; Ko & Splitter, 2003). Utilizando-se o camundongo como modelo para infecção experimental, observou-se atenuação bastante significativa em cepas de *B. abortus* que não possuíam o sistema de secreção tipo IV funcional (Sun et al., 2002). As formas lisas de *B. abortus* são mais resistentes à degradação por fagócitos que as formas rugosas, indicando que o lipopolissacarídeo (LPS) de *Brucella*, apesar de sua baixa atividade biológica, é um fator de virulência com papel importante na sobrevivência das bactérias

no interior das células do hospedeiro (Gorvel & Moreno, 2002; Ko & Splitter, 2003).

2.4. Imunidade contra *Brucella abortus*

A resposta à infecção por *B. abortus* envolve ativação antígeno-específica de linfócitos T CD4+ e CD8+ e produção de anticorpos específicos (Zhan et al., 1993; Golding et al., 2001; Ko & Splitter, 2003). O papel da imunidade inata na infecção por *Brucella* é de reduzir o número inicial de bactérias e promover condições para o desenvolvimento da imunidade adquirida (Golding et al., 2001; Ko & Splitter, 2003). As células "natural killer" (NK) parecem ter importância nos estágios iniciais da infecção promovendo destruição direta de células infectadas e secreção de interferon-γ (INFγ) (Golding et al., 2001).

Um aspecto importante da imunidade inata à brucelose é que, em bovinos, a resistência natural à *B. abortus* é hereditária e a frequência de genótipos resistentes pode ser bastante aumentada pela seleção genética feita por meio de acasalamentos dirigidos (Adams & Templeton, 1995). A frequência de genótipos bovinos naturalmente resistentes na população bovina em geral é de 20%, sendo que o acasalamento de touros e vacas resistentes resultou em aumento desta frequência para 58,6% (Adams & Templeton, 1998). A resistência genética à brucelose é consistente com a existência de dois ou mais genes controlando os fenótipos resistentes. Aparentemente, um gene conhecido como Nramp1 (do inglês: *Natural resistance associated macrophage protein 1*) tem papel fundamental na resistência genética à brucelose. A

clonagem e sequenciamento do Nramp1 bovino foram realizadas por Feng et al. (1996). A resistência natural de bovinos não vacinados é uma característica hereditária associada ao polimorfismo do gene Nramp1 bovino (Adams & Templeton, 1995; Horín et al., 1999). Atualmente nosso grupo tem estudado a influência do genótipo em relação a este polimorfismo do Nramp1 e a resistência à brucelose em condições de campo.

A principal função da imunidade humoral na proteção contra infecção por *B. abortus* parece ser a opsonização (Ko & Splitter, 2003). Uma vez que a proteção contra patógenos intracelulares é dependente basicamente de resposta celular, a proteção contra infecção por *B. abortus* é mediada por linfócitos T, especialmente do tipo Th1, que são mediadores da resposta celular. A produção de INFγ por essas células leva à estimulação da atividade microbicida de macrófagos (Zhan et al., 1993; Oliveira et al., 1998; Oliveira et al., 2002). Além do Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α), que é produzido por macrófagos infectados e que ajuda no controle da taxa de replicação intracelular de *Brucella* sp. (Caron et al., 1994), outras citocinas (IL-2, IL-10, IL-12) também são produzidas e controlam o crescimento intracelular das bactérias (Wyckoff III, 2002).

Estudos recentes indicam que a ativação de linfócitos T CD8+ citotóxicos apresenta especial importância na imunidade contra *Brucella*, devido à produção de INFγ por estas células e eliminação de macrófagos infectados através de mecanismos citotóxicos (Oliveira et al., 1998; Wyckoff III, 2002). Acredita-se que, embora as células T CD4+ desempenhem papel

importante na imunidade contra *B. abortus*, essas células não são essenciais na proteção contra a infecção (Oliveira et al., 1998).

A natureza do estímulo antigênico associado à fatores do hospedeiro determina o desenvolvimento de resposta do tipo Th1 ou Th2. Considerando-se que a resposta Th1 é mediada por células e protetora, enquanto a resposta do tipo Th2 é humoral e ineficaz, a identificação dos抗ígenos de *B. abortus* indutores de resposta Th1 é essencial para o completo conhecimento da imunidade contra esse microorganismo e para o desenvolvimento de vacinas eficazes. Entretanto, até o momento, somente um pequeno número de抗ígenos foi identificado ressaltando a necessidade de mais estudos nessa área (Oliveira et al., 2002).

3. ASPECTOS CLÍNICOS

O estabelecimento e desenvolvimento da infecção dependem da idade e do estado reprodutivo do animal, resistência natural, estado imunológico, via de infecção, dose infectante e virulência da cepa infectante (Nicoletti, 1980; Adams, 2002).

Em vacas gestantes não-vacinadas ocorre aborto após o quinto mês de gestação e geralmente nas gestações subsequentes, o bezerro nasce a termo, embora ainda possa ocorrer aborto (Radostits et al., 2003). Uma pequena porcentagem de novilhas infectadas ao nascimento e sorologicamente negativas pode abortar ou ter bezerro infectado na primeira gestação, sendo consideradas animais com infecção latente e importantes na manutenção da doença no rebanho (Nicoletti, 1980).

Um surto de brucelose em rebanho leiteiro geralmente resulta em queda na produção de leite, aumento na contagem de células somáticas no leite e redução da fertilidade por aumento no intervalo de partos devido à ocorrência de aborto ou de metrite pós-parto (Gorham et al., 1986; Meador & Deyoe, 1989).

B. abortus é uma causa comum de orquite (Lambert et al., 1963; Trichard et al., 1982) que pode estar associada a vesiculite e epididimite (Rankin, 1965; McCaughey & Purcell, 1973). A amostra vacinal B19 também é capaz de causar lesão semelhante no testículo, embora com baixa freqüência (Santos et al., 1998). Os touros podem apresentar febre, anorexia e depressão nas primeiras semanas de infecção (Campero et al., 1990), mas freqüentemente esses sinais são inaparentes. Na fase aguda da infecção, a vesícula seminal pode apresentar um aumento de volume perceptível ao toque retal (Lambert et al., 1963; Campero et al., 1990). Além disso, a bolsa escrotal pode estar aumentada de volume, quente, edematosas e dolorosa à palpação, mas estes sinais podem desaparecer com a cronicidade e evoluir para lesões irreversíveis. Portanto, os touros afetados podem apresentar infertilidade temporária ou permanente dependendo da intensidade das lesões (Radostits et al., 2003). Freqüentemente, as orquites são unilaterais (Trichard et al., 1982), mas mesmo nesses casos, o touro pode se tornar estéril devido à degeneração do testículo contralateral (Lambert et al., 1963; Campero et al., 1990).

Em regiões onde a doença é enzoótica, as vacas com mais de cinco anos de idade podem apresentar higromas nas

articulações e em outros locais associados ao histórico de aborto, artrite e longo intervalo de partos (Musa et al., 1990). *B. abortus* pode ser freqüentemente isolada dos tecidos de bovinos acometidos com sinovite não supurada caracterizada pelo aumento de volume doloroso das articulações (Wyn-Jones et al., 1980; Radostitis et al., 2003) e artrite não supurada progressiva e erosiva tem sido observada em animais jovens provenientes de rebanhos livres vacinados com a cepa B19 (Bracewell & Corbel, 1980, Wyn-Jones et al., 1980). Aparentemente ocorre uma resposta imunológica crônica contra os抗ígenos da amostra vacinal B19 que se depositam na membrana sinovial das articulações causando uma artrite imunomediada (Wyn-Jones et al., 1980).

4. ALTERAÇÕES ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

As descrições das lesões macro e microscópicas se basearam parcialmente em dados de infecções experimentais realizadas recentemente por nosso grupo e que ainda não foram publicados (T. A. Paixão, F. P. Poester, R. L. Santos e A. P. Lage, dados não publicados).

4.1. Alterações macroscópicas

No útero gestante pode ser observada quantidade variável de exsudato fétido, amarelo-amarronzado, floculento e com debríscas necróticas (Fig. 3). As lesões macroscópicas da placenta são características, mas não patognomônicas e nem uniformes, sendo que alguns placentomas estão aparentemente normais e enquanto outros estão necróticos e/ou hemorrágicos (Fig. 4). Os cotilédones afetados estão friáveis, de coloração

amarelada e recobertos por exsudato amarronzado de odor fétido. Os linfonodos regionais podem estar aumentados de volume. Há considerável variação na severidade das lesões placentárias que levam a aborto ou nascimento de prematuros nos casos mais severos ou os bezerros nascem a termo nos casos menos severos (T. A. Paixão, F. P. Poester, R. L. Santos e A. P. Lage, dados não publicados). Lesões macroscópicas não são detectáveis na glândula mamária, mas os linfonodos supramamários freqüentemente encontram-se aumentados de volume (Meador et al., 1989b).

Os fetos abortados podem estar autolisados por ocasião do aborto e geralmente, se apresentam edematosos, contendo líquido avermelhado no tecido subcutâneo e nas cavidades corporais. Em alguns casos, os órgãos abdominais, principalmente fígado e baço estão recobertos por fibrina, caracterizada macroscopicamente como material filamentoso amarelado (Enright et al., 1984; Gorham et al. 1986; T. A. Paixão, F. P. Poester, R. L. Santos e A. P. Lage, dados não publicados). O conteúdo estomacal pode estar turvo, amarelado ou amarronzado com flocos de fibrina (Enright et al., 1984).

A pneumonia é a lesão fetal mais comumente descrita em casos de aborto por brucelose (Adams, 2002), mas nem todos os fetos abortados têm pneumonia (López et al., 1984). Os pulmões podem estar aparentemente normais ou quando alterados, apresentam áreas focais a difusas de coloração acinzentada e firme à palpação, septos interlobulares espessos e edematosos e pleura recoberta por fibrina (Enright et al., 1984). Freqüentemente o único achado é pleurite fibrinosa (Fig. 5),

sem alterações macroscópicas significativas no parênquima pulmonar (T. A. Paixão, F. P. Poester, R. L. Santos e A. P. Lage, dados não publicados). Os linfonodos, mais freqüentemente os ilíacos internos, bronquiais e pré-hepáticos podem estar aumentados de volume, edematosos com espessamento da região cortical e hiperplasia dos nódulos linfoides (Enright et al., 1984; Gorham et al., 1986). O timo pode estar diminuído de tamanho, menos firme que o normal e os septos conjuntivos edematosos e com hemorragias petequiais. As adrenais também podem estar aumentadas de volume com a cortical de 2 a 3 vezes o tamanho esperado (Enright et al., 1984). Porém em alguns casos pericardite fibrinosa pode ser o único achado macroscópico no feto abortado (T. A. Paixão, F. P. Poester, R. L. Santos e A. P. Lage, dados não publicados).

Orquite necrótica é característica de brucelose no touro, mas também pode resultar de outras infecções ou traumas severos e isquemia. Freqüentemente a orquite necrótica está associada a periorquites agudas que se cronificam levando a obliteração completa do suprimento sanguíneo e infarto testicular (Adams, 2002). Ao corte, as áreas de necrose, focais ou difusas, têm coloração amarelada, são friáveis e, às vezes, calcificadas. A túnica vaginal encontra-se espessa, edematosas e com acúmulo de exsudato fibrinopurulento amarelado e floculento (Trichard et al., 1982; Campero et al., 1990). A vesícula seminal e o epidídimo quando afetados estão aumentados de volume, com áreas focais de necrose ou fibrose (Lambert et al., 1963; Rankin, 1965; McCaughey & Purcell, 1973).



Figura 1. Vaca lambendo um feto abortado por outra vaca devido infecção por *Brucella abortus*. A via mais comum de infecção da brucelose bovina é a oral.

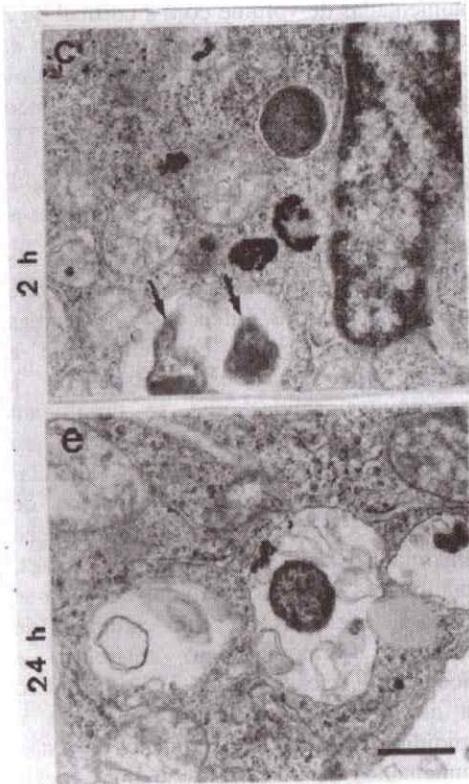


Figura 2. Macrófago bovino contendo *Brucella abortus* entre duas e 24 horas após inoculação experimental. Cortesia do Dr. Luis Ernesto Samartino, INTA, Buenos Aires, Argentina. Barra = 1 μ m.



Figura 3. Grande quantidade de exsudato no útero de vaca que sofreu aborto recente por *Brucella abortus*.



Figura 4. Placentite necrótica por *Brucella abortus*. Extensas áreas de material amarelado que corresponde ao tecido necrótico.

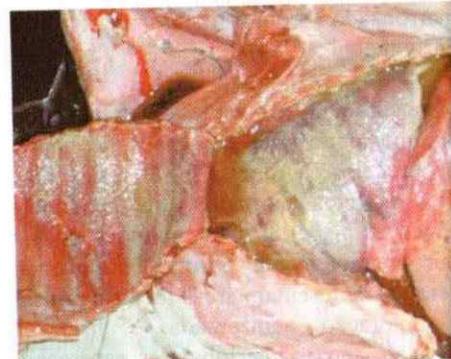


Figura 5. Pleurite fibrinosa em feto abortado devido infecção por *Brucella abortus*.

4.2. Alterações microscópicas

Nas vacas, os linfonodos apresentam hiperplasia dos folículos linfóides, linfadenite multifocal caracterizada por infiltrado de neutrófilos e áreas de hemorragia e, com a cronificação do processo, desenvolvem-se focos de reação inflamatória do tipo granulomatosa. Essas alterações são mais freqüentes nos linfonodos mandibulares, parotídeos, supramamários e ilíacos internos. No baço, ocorre hiperplasia linfóide e infiltrado multifocal de neutrófilos (Payne, 1959; Meador et al., 1988; Meador et al., 1989b).

Após o aborto, observa-se endometrite difusa caracterizada por infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos no interstício do endométrio e também no lume das glândulas endometriais que se apresentam distendidas. Às vezes, o epitélio endometrial está erodido ou mesmo ulcerado e recoberto por fibrina e debríss celulares. A superfície caruncular está necrótica com intenso infiltrado neutrofílico na lamina própria. Exsudato contendo neutrófilos, eritrócitos e bactérias intra e extracelulares é observado no lume uterino e nas vilosidades carunculares. Na placenta as células trofoblásticas corioalantóideas estão distendidas com inúmeros cocobacilos Gram negativos associadas a edema, necrose, acúmulo de fibrina, infiltrado inflamatório de macrófagos e neutrófilos e, às vezes, vasculite (Payne, 1959; Meador et al., 1988; Meador et al., 1989b; Meador e Deyoe, 1989; Paixão; Poester; Santos; Lage⁴). Após quatro a seis semanas, o que

⁴ Paixão, T. A.; Poester, F. P.; Santos, R. L.; Lage, A. P., dados não publicados)

se observa é um infiltrado predominantemente de mononucleares com poucos neutrófilos, multifocal a difuso, moderado e predominantemente periglandular e perivasicular (Meador et al., 1988).

A glândula mamária geralmente apresenta mastite intersticial multifocal ou difusa, discreta, principalmente com infiltração de macrófagos e alguns lumes glandulares repletos de polimorfonucleares. Com a evolução do processo, observa-se somente um acúmulo discreto de linfócitos e poucos macrófagos no parênquima glandular (Payne, 1959; Meador et al., 1988; Meador et al., 1989a,b).

Pleuropneumonia fetal e placentite necrótica são as lesões mais freqüentes observadas na brucelose (Hong et al., 1991). Nos pulmões observa-se broncopneumonia ou pneumonia intersticial com quantidade variável de fibrina e predomínio de infiltrado inflamatório mononuclear com muitos macrófagos e focos de infiltração de neutrófilos. Além disso, os septos interlobulares encontram-se edematosos e, às vezes, observa-se arterite necrótica (Enright et al., Lopes et al., 1984; 1984; Meador et al., 1988). Os linfonodos apresentam hiperplasia dos folículos linfóides e acúmulo de plasmócitos, macrófagos e focos de infiltração de neutrófilos e eosinófilos nos seios medulares. Às vezes podem ser observadas áreas focais com acúmulo de células gigantes e macrófagos epitelioides caracterizando uma linfadenite granulomatosa. No baço observa-se hiperplasia linfóide e no timo depleção linfóide acompanhada de edema e hemorragia focal (Enright et al., 1984).

Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal, focos de necrose e granulomas com células gigantes podem ser observados no fígado, baço e rim (Enright et al., 1984; Meador et al., 1988 Hong et al., 1991). Meningite histiocitária multifocal ou difusa associada ou não à presença da bactéria e vasculite já foi descrita em alguns fetos abortados, embora não seja uma alteração comum. O quadro de meningite pode estar associado com inflamação sistêmica, pericardites, peritonites e artrites fibrinopurulentas (Hong et al., 1991).

No touro, histologicamente observa-se periorquite crônica com exsudato fibrinopurulento e, nos testículos, observa-se inflamação e necrose intratubular com grande quantidade de deíbris celulares e bactérias no lume dos túbulos seminíferos. Conforme as lesões progredem para a cronicidade, o infiltrado inflamatório invade o interstício progredindo para necrose difusa ou formação de granulomas (Lambert et al., 1963; Adams, 2002). Menos freqüentemente, observa-se epididimite e vesiculite seminal necrótica ou granulomatosa (Lambert et al., 1963; Rankin, 1965; McCaughey & Purcell, 1973; Campero et al., 1990).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, MR; CHEVILLE, NF; DEYOE, BL. Bovine ideal dome lymphoepithelial cell: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Pathol.*, v.25, p.28-35, 1988.

ADAMS, LG. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.553-561, 2002.

- ADAMS, LG; TEMPLETON, JW. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.17, p.200-219, 1998.
- ADAMS, LG; TEMPLETON, JW. Identifying candidate genes for natural resistance to brucellosis. *Proceedings...Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. Nevada, p.111-116, 1995.
- ANDERSON, TD; MEADOR, VP; CHEVILLE, NF. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Vet. Pathol.*, v.23, p.219-226, 1986a.
- ANDERSON, TD; MEADOR, VP; CHEVILLE, NF. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet. Pathol.*, v.23, p.227-239, 1986b.
- BOSCHIROLI, ML; OUAHRANI-BETTACHE, S; FOULONGNE, V; MICHAUX-CHARACHON, S; BOURG, G; ALLARDET-SERVENT, A; CAZEVIEILLE, C; LAVIGNE, JP; LIAUTARD, JP; RAMUZ, M; O'CALLAGHAN, D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.341-348, 2002.
- BRACEWELL, CD; CORBEL, MJ. An association between arthritis and persistent serological reactions to *Brucella abortus* in cattle from apparently brucellosis-free herds. *Vet. Rec.*, v.106, p.99-101, 1980.
- CAMPERO, CM; LADDS, PW; HOFFMANN, D; DUFFIELD, B; WATSON, D; FORDYCE, G. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls. *Vet Immunol Immunopathol.*, v.24, n.3, p.235-46, 1990.
- CARON, E. J., CELLIER, M., LIANTARD, P., KOHLER, S. Complementation of a DnaK-deficient *Escherichia coli* strain with dnaK/dnaJ operon of *Brucella ovis* reduces the rate of initial intracellular killing within the monocytic cell line U937. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.120, n.3, p.335-340, 1994.
- DETILLEUX, PG; DEYOE, BL; CHEVILLE, NF. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in vitro cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet. Pathol.*, v.27, p.317-328, 1990a.
- DETILLEUX, PG; DEYOE, BL; CHEVILLE, NF. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.*, v.58, n.7, p.2320-2328, 1990b.
- ENRIGHT, FM; WALKER, JV; JEFFERS, G; DEYOE, BL. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. *Am J Vet Res.*, v.45, p.424-30, 1984.
- FENG, J; LI, Y; HASHAD, M; SCHURR, E; GROS, P; ADAMS, LG; TEMPLETON, JW. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Res.*, v.6, p.956-964, 1996.
- FICHT, TA. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet. Microbiol.*, v.92, p.213-223, 2003.
- FRENCHICK, PJ; MARKHAM, RJ; COCHRANE, AH. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. *Am J Vet Res.*, v.46, n.2, p.332-335, 1985.
- GOLDING, B; SCOTT, DE; SCHAFER, O; HUANG, LY; ZAITSEVA, M; LAPAHAM, C; ELLE, N; GOLDING, H.. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.*, v.3, n.1, p.43-48, 2001.
- GORHAM, SL; ENRIGHT, FM; SNIDER III, TG; ROBERTS, ED. Morphologic lesions in *Brucella abortus* infected ovine fetuses. *Vet. Pathol.*, v.23, n.3, p.331-2, 1986.
- GORVEL, JP; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.281-297, 2002.
- GUZMÁN-VERRI, C; CHAVES-OLARTE, E; VON EICHEL-STREIBER, C; LOPEZ-GONI, I; THELESTAM, M; ARVIDSON, S; GORVEL, JP; MORENO, E. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of CDC42. *J. Biol. Chem.*, v.276, n.48, p.44435-44443, 2001.
- HONG, CB; DONAHUE, JM; GILES, RC JR; POONACHA, KB; TUTTLE, PA; CHEVILLE, NF. *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Vet. Pathol.*, v.28, n.6, p.492-6, 1991.
- HORIN, P; RYCHLÍK, I; TEMPLETON, JW; ADAMS, LG. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. *Euro. J. Immunog.*, v.26, p.311-313, 1999.
- KO J; SPLITTER, GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, n.1, p.65-78, 2003.
- LAMBERT, G; MANTHEI, CA; DEYOE, BL. Studies on *Brucella abortus* infection in bulls. *Am. J. Vet. Res.*, v.24, n.103, p. 1153-1157, 1963.
- LOPEZ, A; HITOS, F; PEREZ, A.; NAVARRO-FIERRO RR. Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. *Can. J. Comp. Med.*, v.48, p. 275-277, 1984.
- MCCAUGHEY, WJ; PURCELL, DA. Brucellosis in bull. *Vet. Rec.*, v. 93, p.336-337, 1973.
- MEADOR, VP; DEYOE, BL. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet. Pathol.*, v.26, p.513-515, 1989.
- MEADOR, VP; DEYOE, BL; CHEVILLE, NF. Effect of nursing on *Brucella abortus* infection of mammary glands of goats. *Vet. Pathol.*, v.26, n.5, p.369-75, 1989a.
- MEADOR, VP; DEYOE, BL; CHEVILLE, NF. Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. *Vet. Pathol.*, v.26, n.5, p.357-68, 1989b.
- MEADOR, VP; HAGEMOSER, WA; DEYOE, BL. Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, n.2, p.274-280, 1988.
- MUSA, MT; JAHANS, KL; FADALLA, ME. Clinical manifestations of brucellosis in cattle of the southern Darfur Province, western Sudan. *J. Comp. Pathol.*, v.103, n.1, p.95-99, 1990.



- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v.24, p.69-95, 1980.
- OLIVEIRA, SC; HARMS, JS; RECH, EL; RODARTE, RS; BOCCA, AL; GOES, AM; SPLITTER, GA. The role of T cells subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, v. 31, p.77-84, 1998.
- OLIVEIRA, SC; SOEURT, N; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.417-424, 2002.
- PARSONS, KR; BLAND, AP; HALL, GA. Follicle associated epithelium of the gut associated lymphoid tissue of cattle. *Vet. Pathol.*, v.28, p.22-29, 1991.
- PAYNE, JM. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *J. Pathol. Bacteriol.*, v.78, p.447-463, 1959.
- PIZARRO-CERDÁ, J; MÉRESSE, S; PARTON, RG; VAN DER GOOT, G; SOLA-LANDA, A; LOPEZ-GONI, I; MORENO, E; GORVEL, JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.*, v.66, n.12, p.5711-5724, 1998.
- RADOSTITS, OM; GAY, CC; BLOOD, DC; HINCHCLIFF, KW. *Veterinary Medicine: A text book of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9^aed., London: W.B.Saunders, 2000, p.867-882.
- RANKIN, JEF. *Brucella abortus* in bull: a study of twelve naturally-infected cases. *Vet. Rec.*, v.77, p.132-135, 1965.
- SAMARTINO, LE; ENRIGHT, FM. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.19, n.1, p.55-63, 1996.
- SAMARTINO, LE; ENRIGHT, FM. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.16, n.2, p.95-101, 1993.
- SANTOS, RL; MARQUES JÚNIOR, AP. Morfofisiologia da placenta bovina. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n.15, p.27-36, 1996.
- SANTOS, RL; PEIXOTO, MTD; SERAKIDES, R; COSTA, GM; MARTINS, NE. Detección de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina-biotina-peroxidasa en el testículo y en el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Archivos de Reproducción Animal*, n.6, p.34-41, 1998.
- SUN, YH; DEN HARTIGH, AB; SANTOS, RL; ADAMS, LG; TSOLIS, RM. *virB*-mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or macrophage NADPH oxidase in macrophages. *Infect. Immun.*, v.70, n.9, p.4826-4832, 2002.
- TRICHARD, CJ; HERR, S; BASTIANELLO, SS; ROUX, D. Unilateral orchitis in a bull caused by *Brucella abortus* biotype1. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.53, n.1, p.60-62, 1982.
- WYCKOFF III, JH. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.395-415, 2002.
- WYN-JONES, G; BAKER, JR; JOHNSON, PM. A clinical and immunopathological study of *Brucella abortus* strain 19-induced arthritis in cattle. *Vet. Rec.*, v.107,n.1, p.5-9, 1980.
- ZHAN, Y; YANG, JL; CHEERS, C. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect. Immun.*, v.61, n.7, p.2841-2847, 1993.

DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA

Fernando Padilla Poester^{1,2}
Luís Ernesto Samartino^{2,3}
Andrey Pereira Lage³

1. INTRODUÇÃO

A correta identificação de animais infectados é uma das bases de um programa de controle ou de vigilância epidemiológica da brucelose bovina. Para se alcançar este objetivo são utilizados vários testes diagnósticos que, em função de suas características de sensibilidade e especificidade, de facilidade de realização, de custo e de disponibilidade, são empregados de maneira distinta nas diferentes situações epidemiológicas que se apresentam.

O diagnóstico da brucelose bovina pode ser realizado por várias metodologias, ou pela combinação delas, como:

¹ Méd. Vet., MSc, Doutorando. LARA-MG, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

² Méd. Vet., PhD. INTA, Centro de Ciencias Vet. y Agron. - Inst. Patobiología, Las Cabañas y Los Reseros, Argentina.

³ Méd. Vet., MMV, DSc, Prof. Adjunto. DMVP da Esc. Vet., da UFMG. alage@vet.ufmg.br .

- ✓ O diagnóstico clínico, baseado em abortos, nascimento de bezerros fracos e esterilidade de machos e fêmeas;
- ✓ o diagnóstico epidemiológico, baseado no histórico do rebanho;
- ✓ o diagnóstico direto, compreendendo o isolamento e identificação do agente etiológico, a reação em cadeia da polimerase e as técnicas de imunoistoquímica;
- ✓ o diagnóstico indireto, a sorologia, com suas diversas técnicas para a demonstração de anticorpos específicos em fluidos orgânicos.

Os diagnósticos clínico e epidemiológico são importantes, pois proporcionam a suspeita inicial da presença da doença, a qual necessita ser confirmada por outras técnicas, sorológicas ou, principalmente, diretas, pois não são suficientes para a conclusão do diagnóstico. Em função disto, o diagnóstico laboratorial exerce um papel de destaque no diagnóstico da brucelose bovina. Os métodos diretos de diagnóstico, como o isolamento e a identificação da bactéria, possuem a vantagem da sua alta especificidade e por identificarem as diferentes espécies e biovariedades do agente. Entretanto, como há a necessidade de se manipular material altamente contaminado e infeccioso, é imperiosa a utilização de instalações e equipamentos de proteção para se manter a biossegurança (nível 3) adequada ao trabalho com *Brucella* sp.

Em função disto, métodos indiretos, por serem mais rápidos, mais baratos e menos perigosos, têm sido utilizados com mais freqüência. Estes métodos utilizam

técnicas que detectam anticorpos em diferentes fluidos corporais.

Apesar dos resultados dos testes sorológicos serem apenas presuntivos e da possibilidade do aparecimento de reações cruzadas com outros microorganismos, a positividade nestes testes é indicativa de uma exposição a抗igenos de *Brucella* sp.

2. COLETA DE MATERIAL

O primeiro passo para um diagnóstico confiável é a boa coleta de material. Por melhor que sejam as condições laboratoriais e a metodologia empregada, erros na coleta de material são muito difíceis de corrigir.

Uma boa prática é enviar juntamente com o material um histórico da propriedade, do caso ou dos achados clínicos e de necropsia. A identificação da origem do material e, principalmente, do animal é essencial, portanto há necessidade de marcação individual dos animais.

O melhor material a ser enviado para o laboratório, quando a escolha forem os métodos diretos de diagnóstico, são secreções e fragmentos de órgãos do feto abortado (pulmão, baço, fígado, conteúdo abomasal e swab retal), placenta materna e fetal e secreções vaginais no pós-parto ou pós-aborto. A quantidade de *B. abortus* nestes materiais após o parto ou aborto é muito grande, o que facilita o isolamento (ORGANIZACIÓN..., 1986; Crawford et al., 1990).

No caso da vaca, além do swab vaginal no pós-parto ou pós-aborto, o material de escolha em animais necropsiados ou de matadouro é o sistema linfático: linfonodos

parotídeo, retrofaríngeo, pré-escapular, ilíaco interno e supramamário e baço. Além destes, cotilédones, útero e glândula mamária são também importantes. Nos machos, além dos linfonodos, o baço, testículos, próstata, epidídimos e vesículas seminais são os órgãos de eleição.

O sangue e o leite não são os principais materiais de escolha para o diagnóstico da brucelose bovina, pois a bacteremia é curta, em torno de 24-48h, e a eliminação pelo leite é intermitente (Alton et al., 1988), o que contribui para diminuir a possibilidade de sucesso no diagnóstico.

O material deve ser acondicionado em recipientes resistentes e a prova de vazamentos, que devem ser corretamente identificados (Manual 2004). Estes recipientes devem ser colocados em sacos plásticos ou outro recipiente também a prova de vazamento, corretamente endereçado. Este conjunto deve ser acondicionado conforme a necessidade, sob refrigeração se o transporte for rápido, ou congelado, se o tempo de transporte e estocagem for longo.

No caso de envio de material para histopatologia, o material deve ser identificado e acondicionado em frasco de boca larga, a prova de vazamentos, em formol tamponado a 10% e mantido à temperatura ambiente. Para um melhor desempenho da imunoistoquímica, o material deve ser entregue rapidamente no laboratório, pois o formol a 10% deve ser trocado por álcool 70% em torno de 18h após o início da fixação (Uzal, 1993).

Deve-se salientar que a brucelose bovina é uma zoonose importante, cuja transmissão também pode ocorrer por aerossol ou

contato direto com material infectado, sendo vaqueiros e veterinários os principais grupos de risco na aquisição da doença, pelo contato com material altamente infectado (Acha, Szyfres, 1986; Santos et al., 2005). Portanto, medidas de segurança devem ser tomadas na coleta e manuseio de material proveniente de aborto ou parto e durante a necropsia de fetos ou animais suspeitos. A utilização de equipamentos de proteção individual como luvas descartáveis, óculos de segurança, máscara (nível de proteção mínimo P2 ou N95) e avental de manga longa são imprescindíveis (Manual, 2004). Após a manipulação de material contaminado, os utensílios e equipamentos de proteção utilizados devem ser esterilizados ou destruídos (Russel et al., 1984; Manual, 2004).

A coleta de sangue para a sorologia não oferece os mesmos riscos apresentados pela manipulação de material contaminado, pois a bacteremia na brucelose bovina é de curta duração. Para a coleta, o ideal é a utilização de tubos siliconizados, com vácuo e sem anticoagulante. Após a coleta do sangue, os tubos devem ficar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar, por cerca de uma hora, para a completa coagulação. Então, o tubo pode ser colocado sob refrigeração (4°C), para retração do coágulo, ou o soro separado decantado imediatamente para outro frasco. Este frasco deve ser corretamente identificado e mantido sob refrigeração, se o tempo de estocagem for curto, ou congelado.

Deve-se evitar o congelamento e descongelamento da amostra, pois isso pode levar a diminuição do título de anticorpos.

3. DIAGNÓSTICO DIRETO

1.1. Isolamento e identificação

O isolamento e identificação é considerado uma técnica de referência para o diagnóstico da brucelose, sendo muito importante não só para o diagnóstico como para o conhecimento da epidemiologia da doença, em função de possibilitar a tipificação das amostras isoladas. No entanto, é um processo demorado e dependente de laboratórios especializados e com segurança biológica, pois *Brucella* sp. são classificadas como microorganismos de nível 3 de biossegurança (Teixeira, Valle, 1996; Nielsen, Ewalt, 2004). Por outro lado, os tecidos mais apropriados para isolamento como baço, linfonodos e glândula mamária nem sempre são possíveis de coletar, principalmente no animal vivo. Sangue, leite e secreções vaginais (exceto no pós-parto ou pós-aborto) apresentam a bactéria apenas de forma intermitente.

Os meios de cultura mais adequados para isolamentos primários devem ser preparados à base de meios sólidos (ágar dextrose, ágar triptose e ágar tripticase soja), os quais facilitam a identificação e o isolamento de colônias típicas e não favorecem a dissociação. É oportuno salientar que algumas amostras de *Brucella*, especialmente em cultivo primário, só se desenvolvem em meios adicionados de 5% de soro e em atmosfera entre 5 e 10% de CO₂ (Alton et al., 1988).

Quando se suspeita que o material possa estar contaminado com bactérias secundárias, ou quando se pesquisa a bactéria no leite, recomenda-se adicionar ao meio básico um suplemento seletivo

B
26 AGO 2005
VETERINÁRIA DA

que suprime os contaminantes sem afetar o crescimento de *Brucella* sp. Dentre os inúmeros suplementos seletivos disponíveis, o que tem sido empregado com mais êxito é o preconizado por Farrell (1974) que emprega polimixina B, bacitracina, actidione, ácido nalidíxico, nistatina e vancomicina.

Após o isolamento de bactérias com características de *Brucella* sp., há necessidade de se identificar a espécie e a biovariedade. Esta caracterização é feita mediante um conjunto de provas bioquímicas (produção de H₂S, atividade ureásica, etc), necessidade de CO₂, crescimento em presença de corantes (tionina e fuccina básica), aglutinação com soro mono-específico (anti-A e anti-M, anti-LPS liso e anti-LPS rugoso) e fagotipagem (Alton et al., 1988).

A especificidade do isolamento e identificação é de 100%, pois possibilita a identificação de espécie e biovariedade dos isolados. Fatores como presença de inibidores (antibióticos, desinfetantes, etc); número reduzido de microorganismos no material; coleta, acondicionamento e transporte inadequados do material; presença de microorganismos contaminantes, erros laboratoriais; etc; que resultam em cultivos negativos ou favorecem o aparecimento de animais falso-negativos, podem comprometer a sensibilidade da técnica.

Por suas características, o isolamento e identificação não é uma técnica que se adapta facilmente ao diagnóstico de rotina em larga escala da brucelose, sendo empregado em programas de controle principalmente para a confirmação de infecção, em rebanhos e no monitoramento

epidemiológico das amostras presentes na região.

1.2. Imunoistoquímica

Técnica versátil que alia a praticidade da utilização de material preparado rotineiramente para a histopatologia com a especificidade das reações antígeno - anticorpo e a detecção espacial de抗ígenos no tecido. A imunoistoquímica vem sendo empregada nos últimos anos no diagnóstico de várias doenças infecciosas (Santos et al., 1998; Campero et al., 2002;).

A imunoistoquímica tem sido utilizada para o diagnóstico de brucelose em material de fetos abortados e no estudo da patogenia da brucelose (Meador et al., 1989; Santos et al., 1998). Além das características já citadas, a imunoistoquímica possui a vantagem de não necessitar que a bactéria esteja viável no tecido, além do diagnóstico poder ser realizado retrospectivamente. Em função de suas características, a imunoistoquímica pode ser um método auxiliar no diagnóstico da brucelose.

1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A introdução de técnicas de amplificação de ácidos nucléicos, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), proporcionou uma popularização da biologia molecular. A PCR é um técnica que possibilita a identificação de um microorganismo a partir do seu DNA presente na amostra. A técnica utiliza um par de iniciadores ("primers"), geralmente específicos para uma sequência gênica do microorganismo, e uma enzima, a DNA

polimerase, geralmente a *Taq* DNA polimerase, para a amplificação do DNA presente na amostra. Após vários ciclos de amplificação (em torno de 30 ciclos), o material amplificado é separado por eletroforese em um gel (agarose ou poliacrilamida), corado por brometo de etídeo e analisado sob iluminação por luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989).

Nos últimos anos, muitos ensaios baseados na técnica de PCR foram descritos para a identificação de *Brucella* sp. Alguns utilizam como alvo sequências conservadas do gênero *Brucella*, como o gene do RNA ribossômico 16S (Herman & de Ridder, 1992) ou o gene que codifica a proteína BCSP31 (Bailey et al., 1992; Costa et al., 1996), possibilitando a identificação genérica dos isolados. Estes ensaios demonstraram ser possível detectar um número bastante reduzido de bactérias na amostra, revelando uma alta especificidade, apresentando, entretanto, resultados falso-positivos somente em amostras de *Ochrobactrum anthropi*, microorganismo do gênero mais relacionado com *Brucella* sp. (Velasco et al., 1998).

Outros ensaios empregando genes como *omp2A* e *omp2B* (Leal-Klevezas et al., 1995; Cloeckaert et al., 1995) ou sequências de inserção como a IS711 (IS6501) (Bricker & Halling, 1994; Ewalt & Bricker, 2000) possibilitaram a identificação de espécie e de biovariedade das amostras, ou mesmo a diferenciação entre as amostras vacinais B19 e RB51 e amostras de campo (Bricker & Halling, 1995; Ewalt & Bricker, 2000). Apesar de sua complexidade, estes ensaios se mostraram muito sensíveis e específicos.

Também foram idealizados e utilizando iniciadores direcionados sequências repetitivas (Mercier e 1996; Tcherneva et al., 1996), pre aleatoriamente no genoma de *Brucel* ou iniciadores aleatórios (Fekete e 1992; Tcherneva et al., 2000). ensaios produzem perfis característi cada amostra e são utilizados para o da epidemiologia da brucelose bovina

Além de seu emprego para a identifi das amostras isoladas, os vários ensa PCR também foram testados pa amplificação a partir de material c como material de aborto, sangue, sec nasais e sêmen (Bricker, 2002) bastante sucesso, apesar de a problemas no preparo e extração de para utilização no ensaio.

Por serem testes extremamente sensi específicos, podendo detectar um m muito pequeno de bactérias, os ensa PCR podem auxiliar na identificaç *Brucella* sp. nos mais diversos ma desde material de aborto até alim como leite e queijo. Entretanto, a necessita de laboratórios e téc especializados para sua execuçõ função de equipamentos que utiliza e evitar contaminações cruzadas.

4. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Os métodos sorológicos são os m mais antigos empregados no diagnóst infecção por *Brucella* sp., existindo como a aglutinação lenta em tubos foram utilizados logo após a identif de *Brucella melitensis* como respo pela febre de Malta no homem no fi século XIX (Nielsen, 2002). Na rotina de diagnóstico da bru

animal, em função da sua simplicidade de execução e interpretação, os métodos sorológicos são os mais freqüentemente utilizados. Nestes testes utilizam-se anticorpos preparados com células bacterianas mortas, coradas ou não, ou frações de *Brucella* sp. que, quando colocados frente a diferentes fluidos orgânicos, detectam anticorpos específicos (Alton et al., 1988; Nielsen, 2002). Estes anticorpos são mais comumente pesquisados no soro, plasma sanguíneo e leite e com menos freqüência no plasma seminal e muco vaginal (Alton et al., 1988).

Os testes sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose bovina podem ser classificados em testes de triagem, testes de vigilância sanitária ou monitoramento e testes confirmatórios.

A maioria dos testes empregados no diagnóstico da brucelose foi desenvolvida em função da dinâmica de formação dos anticorpos posteriores a um estímulo antigênico. A resposta de anticorpos após uma infecção por *B. abortus* patogênica caracteriza-se pelo aparecimento de quatro isotipos de imunoglobulinas: IgM, IgG₁, IgG₂, IgA (Nielsen et al., 1984). Estas imunoglobulinas são dirigidas em sua grande maioria contra o lipopolisacáride (LPS) de *Brucella* sp., principalmente contra cadeia O do LPS. A resposta de IgM aparece poucos dias após a exposição, aumenta rapidamente, atingindo um valor máximo entre 1-2 semanas e depois declina, permanecendo, porém em níveis detectáveis. O isotipo IgG₁ segue um padrão semelhante, sem, no entanto apresentar declínio com o passar do tempo, sendo esta a classe de anticorpos mais importante do ponto de vista diagnóstico.

Os isotipos IgG₂ e IgA aparecem ao redor de duas semanas pós-infecção, aumentam gradualmente, mas permanecem em níveis baixos. Ao contrário, bezerras vacinadas aos oito meses de idade com a amostra B19, embora apresentem uma resposta de anticorpos muito similar à dos animais infectados, com o passar do tempo, os quatro isotipos tendem a desaparecer da circulação e ao redor de 24 meses de idade praticamente todos os animais apresentam-se sorologicamente negativos, embora imunizados, pois a imunidade protetora é principalmente celular (Nielsen et al., 1984; MacMillan, 1990, Wyckoff, 2002).

Em função da sua estrutura pentamérica e de sua decavalência, as imunoglobulinas da classe M (IgM) são aglutininas com grande capacidade aglutinante nas provas de soro-aglutinação. São os anticorpos predominantes na resposta humoral de curta duração contra a maioria dos抗ígenos bacterianos e por isso são a principal fonte de anticorpos responsáveis por reações cruzadas e indesejáveis, inclusive aquelas produzidas por reações contra outras bactérias (Nielsen, 1998). Em função disto, a maioria das modificações introduzidas nos testes diagnósticos de brucelose visam reduzir a atividade desses anticorpos.

1.4. Testes com Antígeno Acidificado

As provas de triagem caracterizam-se por apresentarem alta sensibilidade, o que significa uma percentagem desprezível de animais falso-negativos, serem simples de realizar, econômicas e práticas. Neste grupo destacam-se as provas que empregam antígenos acidificados tamponados: *Card Test* (Nicoletti, 1967),

rosa de bengala ou teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) (Morgan et al, 1969) ou ainda o teste de aglutinação em placa com antígeno acidificado tamponado (BPAT - *buffered plate agglutination test*) (Angus e Barton, 1984). Antígenos preparados com células inteiras de *B. abortus* lisa, em tampão ácido (pH 3,65), têm sido muito úteis em programas de controle e erradicação da brucelose. O baixo pH destes antígenos reduz a atividade aglutinante das IgM, propiciando aumento da aglutinação pelas IgG₁, que são as principais imunoglobulinas relacionadas com a infecção em bovinos (Olascoaga, 1976). Por outro lado, a especificidade desses testes não é alta. No caso do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), a presença de qualquer aglutinação resulta em um teste positivo (Brasil, 2004). Logo, soros com resultados positivos neste teste devem ser submetidos a provas confirmatórias. A Fig. 1 mostra resultado do AAT em soros reagentes positivo e negativo. A grande vantagem das provas de triagem é, no entanto, a eliminação da necessidade de se testar os animais que resultarem negativos no teste, economizando tempo e recursos (Nielsen, 1998).

1.5. Teste do Anel em Leite (TAL)

Outro teste de utilidade empregado é o teste do anel em leite (TAL), usado seja para a identificação de focos, seja para o monitoramento de rebanhos ou zonas livres da enfermidade. Neste teste, um antígeno elaborado com células inteiras, corado com hematoxilina, em pH 4 é colocado frente a uma mistura de leite de várias vacas. Se a amostra contiver anticorpos contra *Brucella* sp., estes anticorpos irão aglutinar as bactérias presentes no antígeno, ao

mesmo tempo em que irão aderir aos glóbulos de gordura do leite via porção Fc da molécula (Olascoaga, 1976). Após incubação a 37°C por 1h, este complexo é então carregado para a superfície da amostra, resultando num anel corado que indica a positividade da amostra. Caso contrário, o antígeno permanece uniformemente disperso no leite e o anel de gordura aparece de cor branca, indicando a negatividade da amostra (MacMillan, 1990; Brasil, 2004) (Fig. 2). O resultado positivo ao TAL do leite de um rebanho indica a possibilidade daquele rebanho possuir animais infectados. Logo os animais deste rebanho devem ser testados individualmente por sorologia para se confirmar a presença de animais infectados.

1.6. Teste de Redução pelo 2-Mercaptoetanol (2ME)

A introdução das chamadas provas complementares ou confirmatórias surgiu da necessidade de se aumentar a especificidade das provas sorológicas. A presença de anticorpos não específicos em soros de animais não infectados por *B. abortus* foi observada por Hess e Roepe (1951) que concluíram por estes anticorpos pertencerem à classe IgM. Estes anticorpos são produzidos pelo contato dos animais com bactérias que possuem a cadeia O do lipopolissacáride (LPS) semelhante ao de *B. abortus*, como *Salmonella urbana*, *Escherichia coli* (O:116, O:157), *Pseudomonas maltophilia* e *Yersinia enterocolitica* O:9 (MacMillan, 1990; Nielsen et al., 2004). A partir destas observações, diversas provas foram introduzidas com o objetivo de eliminar estes anticorpos. Com base no conhecimento das propriedades das IgM,

Diagnóstico da brucelose bovina

que são anticorpos termolábeis, reduzidos por radicais tiol ou precipitados por substâncias como o rivanol ou agentes quelantes como o EDTA (ácido tetracético etilenodiamina), é que foram sugeridas provas como a da inativação do soro por calor a 56°C (Amerault et al., 1962), do rivanol (Nicoletti, 1969), da redução pelo 2 - mercaptoetanol (2ME) (Anderson et al., 1964) e da aglutinação com EDTA (Nielsen et al., 1979).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) adotou o 2ME como o teste confirmatório oficial, a ser realizado por laboratórios credenciados ou oficiais (Brasil, 2004). Na realização desta prova são utilizadas duas séries de tubos com diluições seriadas dos soros: uma com adição de 2 - mercaptoetanol e outra sem adição de 2 - mercaptoetanol, que corresponde a prova lenta em tubos, e a interpretação é feita por comparação entre ambas.

Se, por exemplo, um soro, revelar título alto na prova lenta e resultado negativo no 2ME, significará a presença de anticorpos inespecíficos. Se, no entanto, o título permanecer o mesmo em ambas as provas, ou apresentar um leve decréscimo no 2ME, significará um predomínio de IgG, ou seja, presença de infecção ativa (Manual, 2004). Este teste é de utilidade para detectar animais cronicamente infectados, cujos resultados na prova de aglutinação podem revelar títulos baixos.

Soros com títulos inferiores a 25UI no - 2ME, indicando ausência ou baixa quantidade de IgG específica, são negativos ou inconclusivos no 2ME, dependendo do seu "status" vacinal. Se os

soros são originários de animais com idade igual ou superior a 24 meses ou que foram vacinados com B19 na idade de três a oito meses, os soros que apresentarem títulos abaixo de 100UI na série de tubos da prova lenta são negativos e aqueles que apresentarem títulos iguais ou superiores a 100UI são considerados inconclusivos. No caso de animais que não foram vacinados ou machos e que tenham idade igual ou superior a oito meses são considerados negativos aqueles que tenham título na série de tubos da prova lenta inferior a 50UI. Aqueles que possuem títulos superiores a 50UI são considerados inconclusivos. Esses animais são considerados inconclusivos por estes soros possuírem títulos de IgM que podem indicar animais no início de infecção, devendo ser, portanto, testados novamente. Os animais que apresentam títulos iguais ou superiores a 25UI na série de tubos com 2 - mercaptoetanol, isto é, apresentarem títulos de IgG específicos, são considerados positivos (Brasil, 2004).

A Fig. 3 representa o teste do 2ME em soro de um animal infectado por *B. abortus*.

1.7. Teste de Fixação do Complemento (FC)

Outra prova considerada complementar ou confirmatória é a prova de fixação do complemento (Olascoaga, 1976) (Fig. 4). Usada desde longa data para o diagnóstico de diversas enfermidades, foi somente a partir dos anos 60 que esta prova passou a ser usada como rotina no diagnóstico da brucelose (Hill, 1963). Tem sido demonstrado que existe uma boa correlação entre os resultados desta prova com a presença da infecção (Alton et al.,

1975). Em casos de infecção crônica, quando há predomínio de IgG, esta prova apresenta resultados positivos, enquanto a soroaglutinação pode apresentar títulos baixos ou mesmo ausência de aglutinação (MacMillan, 1990). Animais vacinados com B19 entre três a oito meses, tornam-se negativos à fixação do complemento seis meses após a vacinação, ou seja, bem antes da soroaglutinação (Morgan, 1967).

Esta prova apresenta a desvantagem de ser bastante laboriosa e poucos laboratórios a mantém como rotina, sendo reservada para uso em situações especiais.

No Brasil está aprovada como teste confirmatório de diagnóstico para ser executada por laboratórios oficiais (Brasil, 2004). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) coloca a FC entre as provas a serem empregadas para o diagnóstico de brucelose em animais destinados ao trânsito internacional (Nielsen, Ewalt, 2004).

1.8. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

O avanço nos programas de erradicação da brucelose em alguns países, o qual levou à redução da prevalência da infecção a níveis muito baixos, gerou a necessidade de se dispor de técnicas sorológicas altamente específicas, de fácil execução e capazes de diminuir a taxa de falso-positivos em função, principalmente, da vacinação com a amostra B19. Estas provas, mais conhecidas como ensaios de ligação primária (*primary binding assays*), apareceram na década de 1980, na forma de ensaios imunoenzimáticos, e se caracterizam pela ligação dos anticorpos diretamente ao antígeno, sem a necessidade

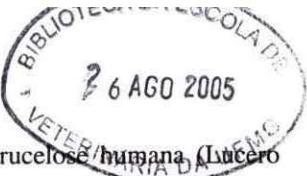
de uma função secundária como ocorre, por exemplo, na aglutinação. Este imunocomplexo é então detectado por uma segunda reação, a qual envolve a conversão de um substrato incolor a colorido pela atividade de uma enzima ligada ao anticorpo secundário (Nielsen et al., 1989).

Vários formatos de provas imunoenzimáticas foram descritos na literatura, os quais vão desde provas de ELISA indiretas (com diferentes抗ígenos e conjugados) (Nielsen e Gall, 1994) a ELISA competitivas (Nielsen et al. 1989; MacMillan et al., 1990) (Fig. 5).

As principais vantagens do uso de provas imunoenzimáticas são: a facilidade com que se podem ajustar os valores de sensibilidade e especificidade; a sua automação (parcial ou total), permitindo a realização de um número grande de testes; a interpretação objetiva dos resultados e a padronização dos testes. Estas provas têm como desvantagem apresentarem um custo relativamente alto no momento da sua implantação no laboratório (Nielsen, 1998).

1.8.1. ELISA Indireto (iELISA)

O iELISA emprega em sua fase sólida como antígeno o lipopolissacáride (LPS) purificado de amostras lisas de *B. abortus*. Os anticorpos contra *B. abortus* presentes no soro em teste se aderem ao antígeno e após lavagens da placa serão detectados por um conjugado anti-IgG bovina. Após a adição c' é um substrato incolor haverá desenvolvimento de cor em função da



Diagnóstico da brucelose bovina



Figura 1 – Teste do Antígeno Acidificado Tamponado – Soro reagente positivo (A) apresentando grumos e soro reagente negativo (B) sem grumos.



Figura 2 – Teste do Anel em Leite. Nos tubos 2 e 3 são vistos leites reagentes ao TAL. Tubo 1 controle positivo. Tubo 4 controle negativo.

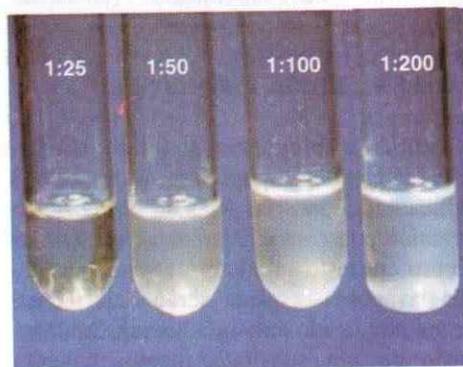


Figura 3 – Teste de redução pelo 2-mercaptopetanol – Soro apresentando título de 25 UI na série de tubos com 2-mercaptopetanol. Na diluição de 1:25 a coluna de líquido se encontra límpida com presença de flocos da aglutinação no fundo do tubo. Nas demais diluições o antígeno permanece em suspensão e não há aglutinação.

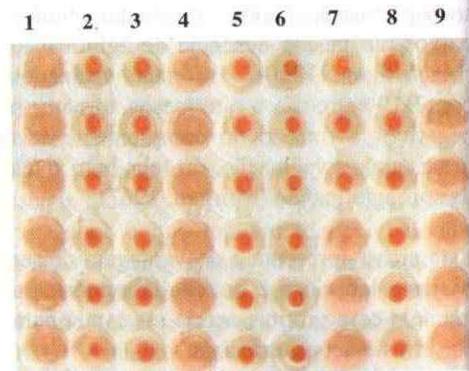


Figura 4 – Teste de Fixação de Complemento. Soros 1 e 4 – Soros negativos; Soros 2, 3, 5, 6 e 7 – Soros positivos com títulos diferentes; Soro 8 – Controle positivo. Soro 9 – Controle negativo.

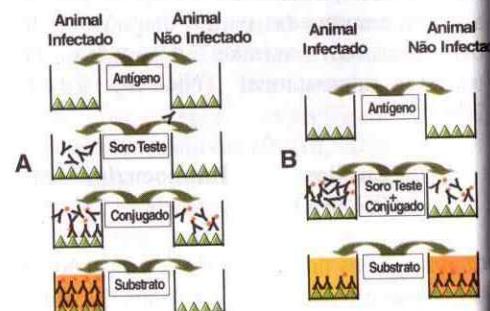


Figura 5 – Representação esquemática de ELISA indireto (iELISA) (A) e ELISA competitivo (cELISA) (B). Na primeira fase dos testes, o antígeno, cadeia O ou LPS de *B. abortus*, é adsorvido na fase sólida (). No iELISA, é adicionado na fase subsequente o soro teste, que pode conter IgG anticadeia O ou LPS de *B. abortus* (Y). Em seguida é adicionado anticorpo monoclonal anti-IgG bovina marcado com peroxidase (Y). No cELISA o soro teste e anticorpo monoclonal anticadeia O ou LPS de *B. abortus* são colocados no "pocinho" na mesma fase do teste. Na última fase de ambos os ensaios, o substrato incolor é adicionado. Quanto maior a quantidade de conjugado nos "pocinhos" maior será a quebra do substrato e consequente desenvolvimento de cor. Entre todas as fases são realizadas lavagens para a remoção dos reagentes não aderidos.

quebra do substrato pela enzima conjugada ao anticorpo anti-IgG bovina. Portanto, quanto maior a intensidade da cor desenvolvida, maior a quantidade de anticorpos contra *Brucella* sp. no soro testado.

Além de ser realizado com soro bovino, o teste também tem sido utilizado para a detecção de anticorpos anti-*Brucella* em leite bovino e soros de caprinos ovinos e suínos (Nielsen, 2002; Olsen, 2004).

1.8.2. ELISA Competitivo (cELISA)

O cELISA também utiliza em sua fase sólida o lipopolissacáride (LPS) purificado de amostras lisas de *B. abortus* como antígeno. O soro a ser testado é adicionado à placa juntamente com um anticorpo monoclonal específico para a cadeia O ou LPS de *B. abortus* (Nielsen et al., 1995; MacMillan, Stack, 2000; Nielsen, 2002; Nielsen, Ewalt, 2004). Este monoclonal compete pelo LPS adsorvido na fase sólida com os anticorpos presentes no soro. Como o anticorpo monoclonal é conjugado a uma enzima, após a adição do substrato incolor, haverá desenvolvimento de cor pela quebra do substrato, indicando negatividade da reação. Neste caso, quanto maior a intensidade de cor, maior a quantidade de anticorpos monoclonais aderidos à placa e, consequentemente, menor a quantidade de anticorpos anti-*Brucella* sp. presentes no soro testado.

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconiza este ensaio como teste recomendado para o diagnóstico de brucelose em animais destinados ao trânsito internacional (Nielsen, Ewalt, 2004). Tem sido usado também no

diagnóstico da brucelose humana (Lucero et al., 1999).

1.9. Ensaio de Polarização Fluorescente (FPA)

Recentemente, uma prova baseada em ensaios de polarização, chamada ensaio de polarização fluorescente (FPA), foi validada para uso inicialmente em soros bovinos e com a finalidade de ser usada a campo (Nielsen et al., 2001).

Esta prova baseia-se no fato de moléculas em suspensão apresentarem um taxa de rotação inversamente proporcional ao seu tamanho. Este ensaio utiliza moléculas marcadas com um fluorótopo que são analisadas sob luz polarizada. O tempo de rotação destas moléculas pode ser medido, nos planos vertical e horizontal, por um analisador de polarização fluorescente.

Para o diagnóstico de brucelose, empregue-se um antígeno constituído pela cadeia O do LPS de *B. abortus* com tamanho aproximado de 22 KDa, marcado com isotiocianato de fluoresceína. Antes de se adicionar o antígeno ao soro, faz-se uma leitura apenas com o soro diluído para se obter o "ruído de fundo" da amostra. Logo após, o antígeno é adicionado ao soro diluído e incubado por dois minutos. A seguir o analisador faz a leitura do resultado, subtraindo a leitura final da inicial, sendo o resultado apresentado em unidades de milipolarização (Nielsen et al., 1996; Nielsen et al., 2000). Quando há formação do complexo antígeno-anticorpo, este apresentará um tamanho maior que o do antígeno isolado, logo sua velocidade de rotação será mais lenta, o que será medido e registrado pelo analisador. Um ponto de corte foi estabelecido em

unidades de milipolarização, indicando que os soros com resultados acima deste valor são considerados positivos e aqueles com resultados inferiores são considerados negativos.

Esta prova pode ser realizada a campo, desde que acoplada a um computador portátil, podendo ser usada com soro, leite ou mesmo sangue total (com anticoagulante EDTA), tendo sido validada também para uso em diversas espécies incluindo bovinos, suínos, bisões e cervídeos (Nielsen e Gall, 2001), bem como na espécie humana (Lucero et al., 2003). As vantagens desta prova são a rapidez na obtenção dos resultados, a facilidade de realização a campo e a capacidade de reagir apenas com soros de animais infectados. As desvantagens decorrem da atual ausência de registro comercial dos reagentes (antígeno) e do investimento inicial para aquisição do analisador. Este teste também se mostrou útil no diagnóstico da brucelose humana.

Em trabalhos recentes de avaliação e validação de testes para diagnóstico de brucelose, o FPA tem mostrado ser, juntamente com o cELISA, um dos testes com melhor desempenho (soma dos valores de sensibilidade e especificidade) (Samartino et al., 1999; Nielsen, 2002; McGiven et al., 2004).

5. UTILIZAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS EM PROGRAMAS DE CONTROLE DE BRUCELOSE BOVINA

Os testes sorológicos têm aplicações distintas em um programa de controle e erradicação de brucelose em função de suas características de sensibilidade,

especificidade, valor preditivo positivo e negativo e da prevalência da doença na população a ser testada.

A sensibilidade e a especificidade são características intrínsecas dos testes diagnósticos e não são influenciadas pela prevalência da doença na população. A sensibilidade de um teste diagnóstico é a probabilidade de um animal infectado ser classificado como positivo no teste e a especificidade é a probabilidade de um animal não infectado ser classificado com negativo no teste (Kramer, 1988; Henken et al., 1997, Tarabla, 2000).

O valor preditivo positivo é a proporção de animais positivos no teste que estão infectados e o valor preditivo negativo é a proporção de animais negativos no teste que não estão infectados (Kramer, 1988; Henken et al., 1997, Tarabla, 2000). Estas características dos testes diagnósticos são muito importantes para o médico veterinário que recebe o resultado de um teste diagnóstico, pois mostra a utilidade deste teste para a elucidação do quadro em questão. Estas características dos testes diagnósticos são especialmente influenciadas pela prevalência da doença (Kramer, 1988; Henken et al., 1997, Tarabla, 2000, Manual, 2004). Portanto, em situações de alta prevalência, o valor preditivo positivo se apresenta alto e o valor preditivo negativo se apresenta baixo. Ao contrário, em situações de baixa prevalência o valor preditivo positivo de um teste diagnóstico é baixo e o valor preditivo negativo é alto. Além disto, em situações de baixa prevalência da doença o valor preditivo positivo é altamente influenciado pela especificidade dos testes diagnósticos (Kramer, 1988; Henken et al., 1997, Tarabla, 2000, Manual, 2004).

Como os programas de controle e erradicação visam diminuir consideravelmente a prevalência até atingir-se uma situação de ausência de doença, ou seja, prevalência zero, o desempenho dos testes diagnósticos tende a diferir durante a evolução dos programas, exigindo sensibilidade e especificidade de diagnóstico muito próximas de 100% nas fases finais de erradicação ou em zonas livres de doença. Em função da dificuldade de se obter um teste diagnóstico com estas características, os programas sanitários empregam como estratégia a utilização de testes em série (Henken et al., 1997, Tarabla, 2000, Manual, 2004).

Os testes de triagem são, em geral, testes de alta sensibilidade. Isto possibilita a detecção do maior número possível de animais infectados. Entretanto, estes testes podem apresentar resultados falso-positivos em função de sua especificidade não ser muito alta. Da mesma forma, os testes utilizados no monitoramento ou vigilância sanitária também são escolhidos baseado em sua alta sensibilidade, portanto também podem apresentar taxas elevadas de resultados falso-positivos em função da população que está sendo testada. Por causa da presença destes resultados falso-positivos, estes materiais devem ser testados novamente em provas confirmatórias, as quais devem ter alta especificidade.

Geralmente os programas de controle de brucelose baseados em diagnóstico e sacrifício dos animais infectados, tendo em vista o alto custo dos resultados falso-

positivos, seja para o produtor, seja para o programa, utilizam uma estratégia de testes em série. Para tanto, empregam um teste de triagem (AAT) com a confirmação dos animais reagentes neste primeiro teste em um teste complementar de alta especificidade (2ME ou FC). Este tipo de estratégia é a empregada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (Brasil, 2004; Manual, 2004). A utilização dos testes em série visa aumentar a especificidade geral do diagnóstico que, deste modo, é superior à especificidade de cada um deles isoladamente (Henken et al., 1997, Tarabla, 2000; Manual, 2004).

Atualmente no Brasil estão aprovados para o diagnóstico da brucelose bovina como teste de triagem o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e de monitoramento ou vigilância sanitária o teste do anel em leite (TAL). Como testes confirmatórios, os testes de redução pelo 2-mercaptopeno (2ME) e de fixação de complemento (FC) (Brasil, 2004).

Outros testes como o ELISA Indireto (iELISA), o ELISA Competitivo (cELISA) e o teste de polarização fluorescente (FPA), por terem se mostrado muito sensíveis e específicos são recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e podem vir a ser considerados para o diagnóstico de brucelose no país. A Tabela 1 resume a sensibilidade e a especificidade dos testes aprovados pelo PNCEBT (Brasil, 2004), assim como dos ELISA e do teste de polarização fluorescente.

TABELA 1 – Sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para diagnóstico de brucelose bovina¹

Teste	Sensibilidade ²	Especificidade ²	Referência
AAT ³	21,0 - 98,3	68,8 - 100	Van Aert et al. (1984); Lord et al. (1989)
TAL ⁴	66,0 - 98,7	57,5 - 97,0	Huber, Nicoletti (1986); Rolfe, Sykes (1987)
2ME ⁵	56,2 - 100	99,8 - 100	Stemshorn et al. (1985); Lord et al. (1989); Saravi et al. (1995)
FC ⁶	23,0 - 97,1	30,6 - 100	Van Aert et al. (1984); Huber & Nicoletti (1986); Saravi et al. (1995); McGiven et al. (2003)
iELISA ⁷	92,5 - 100	90,6 - 100	Dohoo et al. (1986); Rojas & Alonso (1994); McGiven et al. (2003)
cELISA ⁸	95,2 - 100	99,7 - 99,8	Nielsen & Gall (2001); McGiven et al. (2003)
FPA ⁹	96,6 - 99,3	96,9 - 100	Dajer et al. (1999); Nielsen & Gall (2001); McGiven et al. (2003)

1 - Modificado de Nielsen (2002)

2 - Intervalo entre o pior e o melhor resultado encontrado

3 - AAT - Teste do Antígeno Acidificado Tamponado

4 - TAL - Teste do Anel em Leite

5 - 2ME - Teste do 2 - mercaptoetanol

6 - FC - Teste de Fixação de Complementos

7 - iELISA - ELISA Indireto

8 - cELISA - ELISA Competitivo

9 - FPA - Ensaio de Polarização Fluorescente

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2.ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 1986.

ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. *Aust. Vet. J.*, v.51, p.57-63, 1975.

AMERIAULT, T.E.; MANTHEI, C.A.; GOODE, E.R.; LAMBERT, G. A heat inactivation test for differentiating specific and non-specific agglutination reactions for bovine brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.22, p.564-568, 1962.

ANDERSON, R.K.; JENNESS, R.; BRUMFIELD, H.P.; GOUGH, P. *Brucella*-agglutinating antibodies. Relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. *Science*, v.143, p.1134-1135, 1964.

ANGUS, R.; BARTON, C. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in the presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, v.56, p.349-358, 1984.

BAILY, G.G., KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 95, 271 -275, 1992.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 6 de 8 de janeiro de 2004 Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 jan. 2004, Seção 1, p. 6 - 10.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. *Vet. Mic.*, v.90, p.435-446, 2002.

BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 2660 - 2666, 1994.

BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Enhancement of *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB 51. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 1640 - 1642, 1995.

FARRELL, I.D. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci.*, v.16, p.280-286, 1974.

FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M.; STICH, R.W. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.*, v. 174, p. 7778 - 7783, 1992.

CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C.; CIPOLLA, A.L.; MOORE, D.P.; POSO, M.A.; ODRIZOZOLA, E. Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J. Vet. Med.*, v. 49, p. 379 - 383, 2002.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; GREPINET, O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiol.*, v. 141, p. 2111 - 2121, 1995.

COSTA, M.; GUILLON, J.P.; GARIN-BASTUJI, B.; THIEBAUD, M.; DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 81, p. 267 - 275, 1996.

CRAWFORD, R.P., HUBER, J.D., ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, p. 131-151, 1990.

DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGRAS, S.; GUTIERREZ, E.; PENA, G.; GURRIA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. *Prev. Vet. Med.*, v. 14, p. 67 - 73, 1999.

DOHOO, I.; WRIGHT, P.; RUCKERBAUER, G.; SAMGH, B.; ROBERTSON, F.; FORBES, L. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can. J. Vet. Res.*, v. 50, p. 485 - 493, 1986.

EWALT, D.R.; BRICKER, B.J. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella* *abortus* field strain isolates and the vaccine strains 19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 3085 - 3086, 2000.

FARRELL, I.D. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci.*, v.16, p.280-286, 1974.

FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M.; STICH, R.W. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.*, v. 174, p. 7778 - 7783, 1992.

GUEDES, R.M.C., GEBHART, C.J. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diag. Invest.*, v. 15, p. 438-446, 2003.

HENKEN A.M., GRAAT, E. A. M.; CASAL, J. Measurement of disease frequency. In: NOORDHUIZEN, J.P.T.M., FRANKENA, K., van der HOOFD, C.M.; GRAAT, E.A.M. *Application of quantitative methods in Veterinary Epidemiology*, 1997. Wageningen Pers, The Netherlands. p. 63-98

HERMAN, L.; de RIDDER, H. Identification of *Brucella* spp. By using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, p. 2099 - 2101, 1992.

HESS, W.R.; ROEPKE, M.H. A nonspecific *Brucella*-agglutinating substance in bovine serum. Proceedings Society Experimental Biological Medicine, v.77, p.649-672, 1951.

HILL, W.K. Standardization of the complement fixation test for brucellosis. *Bull. Off. Int. Epiz.*, v.60, p.401-410, 1963.

HUBER, J.; NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, rivanol, complement fixation and milk ring test with the isolation rate of *Brucella* *abortus* from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 1529 - 1531, 1986.

KRAMER, M.S. *Clinical epidemiology and biostatistics*. Berlin, Springer Verlag, 1988. 286 p.

LEAL-KLEVÉZAS, D.S.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J. P.; Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. *Arch. Med. Res.*; v. 26, p. 263 - 267, 1995.

LORD, V.; ROLO, M.; CHERWONOGRODSKY, J. Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp in cattle by use of an agar gel immunodiffusion test containing polysaccharide antigen. *Am. J. Vet. Res.*, v. 50, p. 1813 - 1816, 1989.

LUCERO, N.E.; FOGLIA, L.; AYALA, S.M.; GALL, D.; NIELSEN, K.H. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.3245-3248, 1999.

26 AGO 2005

VETERINÁRIA DA UFSC

- LUCERO, N.E.; ESCOBAR, E.I.; AYALA, S.M.; PAULO, P.S.; NIELSEN, K.H. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Medical Microbiology*, v.52, 883-887, 2000.
- MacMILLAN, A.P. Conventional serological tests. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 153-197, 1990.
- MacMILLAN, A.; GREISER-WILDE, I.; MOENNING, V.; MATHIAS, L. A competitive enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. *Dtsch. Tierarztl. Wchnschr.*, v.97, p.83-85, 1990.
- MacMILLAN, A.P., STACK, J. Bovine Brucellosis. In: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 4 ed. Paris: Office International des Epizooties, p. 328 - 345, 2000.
- MAYFIELD, J.E.; BANTLE, J.A.; EWALT, D.R.; MEADOR, V.P.; TABATABAI, L.B. Detection of *Brucella* cells and Cell Components. In: NIELSEN K.; DUNCAN J.R. ed. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 97-120, 1990.
- McGIVEN, J.A.; TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MacMILLAN, A.P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and iELISA. *J. Immunol. Methods*, v. 278, p. 171- 178, 2003.
- MEADOR, V.P.; DEYOE B.L.; CHEVILLE N.F Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. *Vet Pathol.*, v.26, p. 357 - 368, 1989.
- MERCIER, E. JUMAS-BILAK, E.; ALLARDET-SERVENT, A.; O'CALLAGHAN, D.; RAMUZ, M. Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, p. 1299 - 1302, 1996.
- MORGAN, W.B. The serological diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Rec.*, n.80, v.21, p.612- 621, 1967.
- MORGAN, W. B.; MACKINNON, D.; LAWSON, J.; CULLEN, G. The Rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.* v. 85, p.636-637, 1969.
- NICOLETTI, P. Utilization of the card test in brucellosis eradication. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 151, p.1778-1781, 1967.
- NICOLETTI, P. Further evaluation of serological procedures used to diagnose brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.30, p.1811-1821, 1969.
- NIELSEN, K.H. Diagnosis of Brucellosis by detection of antibody: in-use and emerging technologies. *MEMORIAS. III Foro Nacional de Brucelosis*. Acapulco, México, p.79-89, 1998.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v.90, p. 447-459, 2002.
- NIELSEN, K.H.; GALL, D. Advances in the diagnosis of bovine brucellosis: use of enzyme immunoassays. *Gen. Eng. Biotech.*, v.14, p.25-39, 1994.
- NIELSEN K.H.; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *J. Immunoassay*, v.22, p.183-201, 2001.
- NIELSEN, K.H., EWALT, D.R. Bovine Brucellosis. In: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 5 ed. Paris: Office International des Epizooties, p. 328 - 345, 2004.
- NIELSEN, K.H.; KELLY, L. GALL, D., NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 46, p. 285 - 291, 1995.
- NIELSEN, K.H.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICIUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibodies to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Meth.*, v.195, p.161-168, 1996.
- NIELSEN, K.H.; LIN, M.; GALL, D.; JOLLEY, M. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods*, v.22, p.71-76, 2000.
- NIELSEN, K., SMITH, P., WIDDISON, J., GALL, D., KELLY, L., KELLY, W., NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet. Microbiol.*, v. 100, p. 25-30, 2004.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité mixto FAO/OMS de expertos en Brucellosis. Sexto informe. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 149p. 1986. (Serie de Informes Técnicos 740)
- OLASCOAGA, R.C. Diagnóstico serológico de la brucellosis. *Zoonosis*, v. 18, p. 107 – 141, 1976.
- OLSEN, S. Porcine Brucellosis. In: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 5 ed. Paris: Office International des Epizooties, p. 328 - 345, 2004.
- ROJAS, X.; ALONSO, O. ELISA for the diagnosis and epidemiology of *Brucella abortus* infection in cattle in Chile. *IAEA Tecdoc*, 1055, p. 77 - 82, 1994.
- ROLFE, DC, SUKES, WE. Monitoring of dairy herds for *Brucella abortus* infection when prevalence is low. *Aust. Vet. J.*, v. 64, p. 97 – 100, 1987.
- SAMARTINO, L.E.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *J. Immunoassay*, v. 20, p. 115 - 120, 1999.
- SAMBROOK, J., ERISTISCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANTOS, R.L. PEIXOTO, M.T.D.; SERAKIDS, R.; COSTA, G.M.; MARTINS, N.E. Detección de *Brucella abortus* (amuestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina – biotina – peroxidasa em testículo y en epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Arch. Reprod. Ani.*, v. 6, p.34 - 41, 1998.
- SANTOS, R.L.; SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; SAMARTINO, L.E. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cad. Téc. Vet. Zoot.*, v. 47, p. 83-98, 2005.
- SARAVI, M.; WRIGHT, P.; GREGORET, R.; GALL, D. Comparative performance of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 47, p. 93- 99, 1995.
- STEMSHORN, B.; FORBES, L.; EAGLESOME, M.; NIELSEN, K.; ROBERTSON, F.; SAMAGH, B. A comparison of the standard serological tests for diagnosis of bovine brucellosis. *Can. J. Comp. Med.*, v. 49, p. 391 - 394, 1985.
- TARABLA, H. *Epidemiología diagnóstica*. 2000. Universidad Nacional del Litoral, Argentina. 120p.
- TCHERNEVA, E.; RIJPENS, N.; JERSEK, B. HERMAN, L.M. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymerase DNA analysis. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 69 - 80, 2000.
- TEIXEIRA, P., VALLE, S. *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. 1996. FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 362p.
- VAN AERT, A.; BRIOEN, P.; DEKEYSER, P.; UYTTERHAEGEN, L.; SIJENS, R.; BOEYE, V. A comparative study of ELISA and other methods for detection of *Brucella* antibodies in bovine sera. *Vet. Microbiol.*, v. 10, p. 13-21, 1984.
- VELASCO, J., ROMERO, C., LOPEZ-GONI, I., LEIVA, J., DIAZ, R., MORIYON, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 48, p. 759 - 768, 1998.
- WYCKOFF III, J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 395 – 415, 2002.

CONTROLE DA BRUCELOSE BOVINA

Andrey Pereira Lage¹

Fernando Padilla Poester²

Vitor Salvador Picão Gonçalves³

1. INTRODUÇÃO

Em função de sua importância como zoonose, das perdas econômicas causadas pela infecção, da ampliação de mercados e de sua prevenção proporcionar produtos de melhor qualidade sanitária, a brucelose tem sido identificada como uma das doenças cujo controle deverá provocar um grande impacto nos setores produtores de carne e de leite no país.

O controle, e principalmente a erradicação da brucelose, tem demonstrado ser uma tarefa árdua na maioria dos países que enfrentaram o problema. O estabelecimento do controle da doença em diversos níveis populacionais – rebanho, propriedade, região, estado e país – necessitam do esforço conjunto de vários setores responsáveis pela produção de

bovinos e só será alcançado com a compreensão e esforço de todos eles.

O controle da brucelose bovina depende fundamentalmente de dois fatores principais no manejo dos rebanhos acometidos: a prevenção da exposição de animais suscetíveis à *Brucella abortus* e o aumento da resistência da população bovina à infecção.

A diminuição da transmissão aos animais suscetíveis pode ser alcançada pela adoção de várias medidas de manejo, como a restrição das áreas de parição, a separação dos animais infectados e seu posterior descarte, associadas a medidas de higiene e desinfecção.

O aumento da população resistente à infecção por *B. abortus*, com consequente diminuição do número de animais suscetíveis na população, tem sido alcançado com êxito pelo emprego de programas de vacinação sistemática dos animais jovens com vacinas vivas.

A sistematização dessas medidas sanitárias, seja em um rebanho ou em uma região, estado ou país, é de grande importância para o sucesso no controle da brucelose e deve ser realizada por pessoal capacitado, baseado no amplo conhecimento da biologia do agente, das características da doença nos bovinos, dos métodos de diagnóstico e, principalmente, das medidas sanitárias empregadas no controle e erradicação da brucelose.

¹ Méd.Vet., DSc, Prof. Adj. do DMVP, Esc.Vet. da UFMG. alage@vet.ufmg.br

² Méd.Vet., MSc, Doutorando do DMVP da Esc.Vet. da UFMG - LARA-MG, MAPA.

³ Méd.Vet., PhD, Prof. Adj., da FAMV da Universidade de Brasília..

2. CARACTERÍSTICAS DA BRUCELOSE BOVINA IMPORTANTES PARA A IMPLANTAÇÃO DE UM PROGRAMA DE CONTROLE

O delineamento de estratégias para o controle de doenças infecciosas deve ser baseado no conhecimento do agente, da patogenia, da epidemiologia, dos métodos de diagnóstico e da disponibilidade de tratamento e vacinas contra a doença.

Algumas características da brucelose bovina devem ser evidenciadas quando se implementa um programa de controle e erradicação da doença (MacDiarmid, 1994; Sawyer, 1996; Ragan, 2002).

A principal fonte de transmissão entre os bovinos é a ingestão ou contato com material resultante de aborto ou parto de animais infectados, como feto, placenta e secreções, que contém quantidades elevadas do agente (ORGANIZACIÓN..., 1986). A característica gregária dos bovinos, associada à limpeza do feto ou recém-nascido e a ingestão da placenta por animais que estão em contato com os animais que pariram ou abortaram facilita a disseminação da doença no rebanho (Acha e Szyfres, 1986; Crawford et al., 1990).

A maioria dos animais infectados é assintomática e não apresenta sorologia positiva até próximo ao aparecimento dos sinais clínicos. O principal sinal clínico da brucelose bovina, o aborto no terço final da gestação, geralmente só ocorre na primeira gestação após a infecção (Thoen et al., 1993). Consequentemente, a partir da segunda gestação após a infecção, as vacas não apresentam sintomatologia, assim como as fêmeas que não estão gestantes e os machos (Enright, 1990).

O período de incubação da doença também é bastante variável podendo ir de alguns dias a meses ou anos. Um dos grandes determinantes do período de incubação da brucelose nos bovinos é o estado fisiológico dos animais. Quanto mais próximo do final da gestação ocorrer a infecção, menor será o período de incubação, pois mais rápido ocorrerá o aborto. Por outro lado, em fêmeas não gestantes, o período de incubação é maior, pois os sinais clínicos só ocorrerão quando estas se encontrarem nos meses finais de gestação. Apesar de 95 a 98% das filhas de vacas infectadas conseguirem debelar a infecção, uma pequena percentagem de animais pode se infectar no útero e manter a infecção até a vida adulta, só manifestado a doença durante a gestação. Isto obviamente, passa a ter relevância epidemiológica ao se atingirem as etapas finais do controle da brucelose (Crawford et al., 1990).

Os animais mais jovens são mais resistentes à infecção por *B. abortus* conseguindo debelar a infecção. Esta resistência parece ocorrer nos animais antes da puberdade. Após a puberdade, os bovinos se tornam mais suscetíveis à infecção (Crawford et al., 1990).

3. ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DA BRUCELOSE BOVINA

3.1. Vacinação

A observação de que as vacas geralmente desenvolvem resistência ao aparecimento de sintomas clínicos subsequentes ao primeiro aborto, levou vários pesquisadores a se dedicar à pesquisa de

vacinas contra brucelose desde os anos seguintes à identificação da *B. abortus* como agente causal de aborto em bovinos (Adams, 1990).

Destes esforços resultaram várias vacinas vivas atenuadas e vacinas inativadas contendo adjuvantes que se constituíram em importantes ferramentas no controle da brucelose bovina. No entanto, ainda hoje, a procura por uma vacina ideal persists, visando um produto que reúna características como (Nicoletti, 1990; Schurig et al, 2002):

- interferência mínima nos testes sorológicos;
- imunidade de longa duração com uma única dose;
- atenuação e aplicabilidade em animais de qualquer idade;
- estabilidade;
- facilidade de produção e armazenagem;
- ausência de efeitos colaterais;
- inocuidade para o homem.

Com a utilização de novas tecnologias baseadas no DNA recombinante, vacinas de sub-unidades e vacinas de DNA estão em desenvolvimento para tentar preencher estes requisitos (Vemulapalli et al, 2002; Ko & Splitter, 2003).

Dentre as vacinas desenvolvidas contra brucelose para a utilização em bovinos, as vacinas vivas atenuadas, elaboradas com as amostras B19 e RB51 são, na atualidade, as mais empregadas em programas de controle da doença (Schurig et al, 2002).

No Brasil, ambas vacinas, B19 e RB51, encontram-se aprovadas para utilização no

Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (Brasil, 2004), com destaque para a primeira, que é de utilização obrigatória em bezerras de três a oito meses de idade.

A vacinação constitui-se na mais importante medida para o controle da brucelose nos bovinos porque, levando a uma diminuição da prevalência e da incidência da doença, propicia o avanço do programa em direção sua erradicação.

3.2. Vacina B19

A vacina B19 foi e ainda continua sendo largamente empregada em programas de controle em vários países. A amostra foi isolada em 1923 do leite de uma vaca infértil que, após ter ficado à temperatura e atmosfera ambiente por um ano, demonstrou ter sofrido mutações que conduziram à sua atenuação permanente (Nicoletti, 1990). A amostra B19 é empregada como vacina desde o início da década de 1940 e atualmente é recomendada pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (MacMillan e Stack, 2000). A vacina B19 reúne uma série de características importantes que fazem com que ela ainda seja empregada em programas de controle em muitos países. Entre elas estão (Manthei, 1959; Nicoletti, 1990):

- Sua reduzida e estável virulência;
- sua utilização em dose única em bezerras entre três e oito meses conferir imunidade prolongada;
- prevenir o aborto;
- ser altamente atenuada para bovinos;

- causar reações mínimas após a sua aplicação;
- reduzir a infecção em 70-80% dos animais vacinados.

Tem contra si o fato de provocar a formação de anticorpos que se confundem com os anticorpos de infecção nas provas sorológicas, quando aplicada em fêmeas próximas à puberdade. Portanto, um aspecto importante a ser observado na utilização da vacina com a amostra B19 é a idade dos animais (MacMillan, 1990).

É recomendado que a vacinação com B19 seja realizada em fêmeas com idade entre três e oito meses. Isto visa não interferir com a imunidade passiva (três meses) e, principalmente, minimizar interferências no diagnóstico sorológico na idade adulta, além de proteger as bezerras antes de entrarem no período reprodutivo (oito meses). Para animais de puberdade precoce, como algumas raças européias e mesmo animais zebu de elite, a recomendação é que as bezerras sejam vacinadas até no máximo com seis meses de idade (McDiarmid, 1994).

Os efeitos benéficos da vacina B19 contra brucelose podem ser observados em rebanhos vacinados que, após uma década de emprego da vacina B19, apresentaram dez vezes menos reagentes do que os rebanhos não vacinados (Jones e Hooper, 1976). Além disto, quando grandes populações de bovinos são estudadas, há em torno de 82% menos animais reagentes aos testes diagnósticos entre animais vacinados que entre animais não vacinados (Alton, 1978).

A resistência de rebanho conferida pela vacina B19, embora não sendo absoluta,

reduz a severidade dos sintomas clínicos, diminuindo a quantidade de organismos patogênicos que são eliminados no ambiente pelos animais infectados. Entretanto, a B19 não tem efeito curativo, não alterando, portanto, o curso da doença quando aplicada em animais infectados (Manthei, 1959).

Apesar das vantagens citadas, esta vacina apresenta alguns inconvenientes. Dentre eles, a já citada formação de anticorpos que confundem o diagnóstico, tem sido considerado um grande complicador nos programas de erradicação. Este fato, no entanto, é superado pela restrição da idade de vacinação das fêmeas para três a oito meses. Neste caso, os anticorpos desaparecem da circulação sanguínea da maioria dos animais ao atingirem 24 meses de idade (MacMillan, 1990). Além disto, animais nos últimos meses de gestação não devem ser vacinados, pois poderão abortar. Machos também não devem ser vacinados para evitar orquites e artrites (ORGANIZACIÓN..., 1986). Esta amostra é patogênica para o homem, havendo inúmeros relatos na literatura de infecções acidentais, especialmente entre veterinários e vacinadores (Acha e Szyfres, 1986). Em função disso, é importante a utilização de material de proteção individual, máscara, óculos, luvas e avental de manga longa, e seringa descartável durante a vacinação. Após a utilização é necessário fazer o descarte correto dos frascos e seringas utilizadas, destruindo-os pelo calor.

3.3. Vacina RB51

As chamadas brucelas clássicas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) possuem morfologia colonial em fase lisa. Esta

característica colonial é conferida pela presença da cadeia O do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular composta por um homopolímero de perosamina (*N*, formil-4-amino, 4,6-dideoximanose) (Bundle et al, 1987). Colônias lisas podem se tornar espontaneamente rugosas e amostras rugosas podem reverter à forma lisa. Segundo alguns estudos, estas mudanças são mediadas pela modulação ou deleção de genes responsáveis pela síntese da cadeia O ou outros genes responsáveis pela biosíntese do LPS (Winter et al, 1996; Vemulapalli et al, 2000; Moriyón et al., 2004).

De um modo geral, a mudança da morfologia lisa para rugosa está relacionada com uma acentuada baixa na virulência da amostra, fato que foi usado com algum sucesso na elaboração de vacinas no passado (McEwen, 1940) e retomado mais recentemente (Schurig et al, 1991).

A cadeia O, por ser a fração antigênica mais imunodominante, é responsável pela forte resposta humoral na maioria dos animais expostos a *Brucella* sp. lisas e os animais vacinados com a amostra 19 (tipicamente lisa), desenvolvem anticorpos que se confundem com os provocados por infecção (Nicoletti, 1990). A formação e persistência destes anticorpos depende da idade dos animais, dose e vias de inoculação e são um elemento complicador em programas que aplicam o teste e sacrifício de animais sorologicamente positivos (Nicoletti, 1990).

A busca por uma amostra rugosa estável, sem cadeia O, portanto capaz de eliminar o principal inconveniente da vacina B19, fez com que muitos pesquisadores

procurassem uma vacina, capaz de induzir uma sólida imunidade do tipo celular (CMI) sem induzir anticorpos detectáveis nas provas sorológicas de rotina. Uma amostra com estas características foi obtida por diversas passagens da amostra 2308 de *B. abortus*, originalmente lisa e patogênica, em meios seletivos contendo doses subinibitórias de rifampicina. A amostra resultante foi denominada **RB51**, sendo "R" relativo a rugosa (*rough*, em inglês), "B" relativo à *Brucella* e "51" relativo à numeração interna do laboratório (Schurig et al, 1991).

Apesar dos poucos casos de abortos relatados quando da aplicação desta vacina, recomenda-se a não vacinação de fêmeas prenhas. Machos também não devem ser vacinados. A dose recomendada, de 1,0 a $3,4 \times 10^{10}$ bactérias, aplicada em bezerras na idade entre oito e doze meses de idade tem demonstrado que a proteção é muito semelhante à da B19 com a grande vantagem dos animais não reagirem às provas sorológicas de rotina (Stevens et al, 1995).

Estudos sobre a segurança de utilização da RB51 em bovinos demonstraram que a RB51 não é eliminada no ambiente e que não permanece no organismo dos animais por período superior a 12 semanas (Stevens et al, 1997).

Medidas de segurança devem ser tomadas no manuseio da vacina. A amostra RB51 é potencialmente patogênica para o homem e alguns relatos sobre infecções humanas pela amostra RB51 têm sido registrados (Ashford et al, 2004). As recomendações de segurança na aplicação e descarte da vacina B19 também se aplicam à RB51.

Experimentos realizados em bovinos jovens e adultos, mostraram que a vacina RB51 apresenta níveis de proteção semelhantes ao da B19 frente a um desafio moderado com amostras selvagens de *B. abortus* (Cheville et al, 1992; Olsen et al, 1999). A vacinação de animais adultos com RB51 no Brasil, envolvendo desafio experimental, demonstrou que a proteção obtida não foi significativamente diferente daquela obtida com a B19 e que a vacinação com RB51 diminui significativamente o número de abortos. O grupo controle, não vacinado, apresentou um risco 2,5 vezes maior de aborto do que o grupo vacinado com RB51 (Poester et al, 2004).

A vacina RB51 foi aprovada em 1996 nos USA, tornando-se, a partir daí, a vacina oficial do programa de controle e erradicação norte-americano, tendo em vista que a situação epidemiológica da brucelose naquele país, que já estava em fase muito avançada de erradicação, indicava a necessidade de uma vacina que não interferisse com os testes diagnósticos (Ragan, 2002).

Em função dos resultados positivos de proteção apresentados pela vacina RB51 em diversos experimentos, associados ao fato de não estimular anticorpos contra a cadeia O, alguns países como os Estados Unidos e o Chile, decidiram substituir a vacina B19 pela RB51 (Ragan, 2002; Rivera et al, 2002). Outros países como o México, Paraguai, Venezuela e alguns países da América Central a estão usando associada à B19 (Luna-Martinez, 2002; Baumgarten, 2002; Vargas, 2002; Moreno, 2002). Em termos gerais, pode afirmar-se que a vacina RB51 vem sendo adotada em situações de intensificação do diagnóstico

sorológico, em fases avançadas de erradicação.

No Brasil, a sua aprovação pelo PNCEB¹ para utilização em animais com idade acima de oito meses (Brasil, 2004), poderá ser um ferramenta de grande valia para controle da brucelose em rebanhos que possuam fêmeas adultas não vacinadas necessitem aumentar o grau de proteção destes animais, ou ainda em rebanhos com surtos de brucelose. Assim, resultará em uma menor disseminação do agente, com consequente incremento da rapidez no processo de controle da brucelose no rebanho. Isto acarretará menor prejuízo pela diminuição de abortos e outras perdas decorrentes da infecção por *B. abortus*.

4. IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS INFECTADOS

A base para a segregação ou sacrifício de animais infectados é sua identificação. Cívarios testes diagnósticos disponíveis podem ser utilizados tendo por objetivos a identificação dos animais infectados (MacMillan, 1990; Nielsen, 2002). Geralmente a estratégia utilizada é o emprego de uma metodologia de testes em série, onde se realiza a triagem com um teste de alta sensibilidade e se confirmam os reagentes no teste de triagem com um teste de alta sensibilidade e especificidade (MacMillan & Stack, 2000). O emprego de testes em série visa aumentar a especificidade do diagnóstico (Henken et al., 1997). Isto é muito importante principalmente em programas que utilizam o sacrifício dos animais infectados, onde as consequências de resultados falso-positivos podem conduzir ao sacrifício sistemático de animais sem infecção.

Para a realização do diagnóstico de brucelose, é essencial que os animais da propriedade possuam identificação individual (MacDiarmid, 1994; Sawyer, 1996; Ragan, 2002), pois após a obtenção dos resultados é necessário separar os animais infectados para que as providências adequadas sejam tomadas. Ademais, os exames devem ser realizados por técnicos e laboratórios treinados, mantendo-se um rígido controle de qualidade sobre os mesmos, e os resultados devem ser corretamente interpretados por técnicos capacitados (MacDiarmid, 1994; Ragan, 2002).

5. SEPARAÇÃO DOS ANIMAIS INFECTADOS

Após a identificação dos animais infectados, estes devem ser separados imediatamente dos outros animais para se evitar a disseminação da doença (ORGANIZACIÓN..., 1986; MacMillan & Stack, 2000; Ragan, 2002). No caso de animais leiteiros, estes devem ser retirados da ordenha, para se diminuir riscos para a saúde pública (Acha & Szyfres, 1986).

Quanto mais rápido os animais infectados forem separados dos animais negativos ao diagnóstico, mais eficiente será o controle.

A estratégia de segregação e criação dos animais infectados em retiros ou propriedades separadas, geralmente não apresenta bons resultados, pois é necessária uma separação física muito eficiente para se evitar que a *B. abortus* circule via animais, utensílios ou vestuário contaminados. Como esta separação é difícil de ser obtida, a reinfecção do plantel negativo, mesmo por germes carreados mecanicamente pelos tratadores, é uma

ameaça constante e o tempo médio de erradicação da brucelose pela segregação é mais longo que pelo sacrifício dos animais infectados (ORGANIZACIÓN..., 1986). Esta estratégia também não está isenta de dificuldades de fiscalização das normas sanitárias, facilitando a venda ilícita de animais infectados.

6. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS INFECTADOS

Uma das principais estratégias empregadas no controle da brucelose nos países que conseguiram sua erradicação ou que se encontram em fase avançada do controle da doença foi o sacrifício dos animais infectados (ORGANIZACIÓN..., 1986; MacDiarmid, 1994; MacMillan & Stack, 2000; Ragan, 2002). Esta estratégia possibilita a interrupção da transmissão da doença rapidamente e é comprovadamente a forma mais eficaz de controle, apesar de ser a parte mais onerosa de um programa de controle e erradicação da brucelose (Bernués et al., 1997).

Há necessidade de se implementar estímulos para que os produtores colaborem com o controle, sacrificando os animais infectados. Estes estímulos podem vir de incentivos pecuniários dirigidos a propriedades com animais livres de brucelose, de fundos de indenização, da conquista de mercados ou de linhas de crédito para a reposição de animais.

7. LIMPEZA E DESINFECÇÃO DE INSTALAÇÕES E UTENSÍLIOS

A resistência das bactérias do gênero *Brucella* no meio ambiente é variável e a sua permanência no ambiente pode ser longa, em função de algumas

características destes microorganismos que não são capsulados ou esporulados (Wray, 1975; Russel et al., 1984; Crawford et al., 1990).

Dentro de um programa de controle da brucelose, a limpeza e a desinfecção são muito importantes, pois além da longa permanência no ambiente, a carga infectante é muito alta em função do grande número de microorganismos eliminados nas secreções e materiais de parto e aborto (Alexander et al., 1981).

As bactérias do gênero *Brucella* são sensíveis a vários desinfetantes comumente utilizados em veterinária como cal (hidróxido de cálcio) a 15%, cresóis a 5%, fenol a 1%, formol a 5% e hipocloritos de cálcio ou de sódio a 2,5% em exposição por uma hora à temperatura ambiente para a maioria deles (Russel et al., 1984). Estes desinfetantes podem ser utilizados para a desinfecção de instalações e utensílios, assim como de solos (cal) contaminados por material infectado.

Para melhorar a eficácia dos desinfetantes empregados é aconselhável a limpeza prévia do material ou local a ser desinfetado, pois alguns desinfetantes, principalmente os hipocloritos, são inativados na presença de matéria orgânica (Russel et al., 1984).

Durante a limpeza e desinfecção é necessário a utilização de equipamentos de proteção individual como luvas, óculos, aventais e máscaras com as características necessárias (filtro de partículas e gases orgânicos), para se evitar a contaminação com *B. abortus* e os efeitos nocivos das substâncias desinfetantes.

8. DESTRUÇÃO DE RESTOS PLACENTÁRIOS E FETOS ABORTADOS

Fetos abortados, restos placentários e secreções vaginais são as principais fontes de *B. abortus* para os animais suscetíveis (Crawford et al., 1990; Ragan, 2002). Desta forma, a correta eliminação destes materiais contribui de forma efetiva para a diminuição da carga infectante no ambiente.

Estes materiais devem ser incinerados, destruídos pelo calor ou enterrados em locais que não venham a contaminar o lençol freático. Durante o processo de coleta e destruição desses materiais é importante que sejam tomadas medidas que evitem a contaminação de quem manipula o material, pela utilização de equipamentos de proteção individual adequados, e a maior contaminação ambiental, pela contenção do material.

9. UTILIZAÇÃO DE PASTO MATERNIDADE

Como o principal mecanismo de transmissão da brucelose ocorre após o parto ou aborto pelo contato de animais suscetíveis com restos placentários, fetos abortados e secreções vaginais de animais que abortaram ou pariram, medidas que visem diminuir a transmissão da brucelose neste momento terão grande impacto no controle da doença.

Isto pode ser conseguido pela utilização de pastos maternidade onde se possam separar os animais e diminuir o contato de animais suscetíveis com animais infectados que venham a abortar ou parir, interrompendo a

26 AGO 2005

VETERINÁRIA DA UFSC

cadeia de transmissão da doença (Crawford et al., 1990).

10. TESTES E QUARENTENA NA INTRODUÇÃO DE ANIMAIS

Em algumas situações, como o trânsito de animais para a reprodução ou a aquisição de animais para introdução no rebanho, principalmente se este rebanho é livre de brucelose, é necessária a utilização de testes com grande sensibilidade para se evitar a introdução de animais falsos negativos e a consequente disseminação da brucelose no plantel. Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico, somente os animais negativos nos testes de triagem na origem e no destino, intervalados de 30 a 60 dias, podem transitar ou ser adquiridos (Brasil, 2004). A quarentena a que os animais devem ser submetidos antes de serem introduzidos no plantel visa aumentar a sensibilidade do diagnóstico, pois permite que animais não reagentes aos testes e em período de incubação da doença possam reagir positivamente no teste subsequente. Isto diminui o erro diagnóstico, evitando-se a introdução de animais falsos negativos em rebanhos ou áreas livres. A função do médico veterinário na orientação técnica do produtor é fundamental para a manutenção de altos padrões sanitários e diminuição das perdas decorrentes de doenças nos animais e nunca deve ser subestimada.

11. EDUCAÇÃO SANITÁRIA

A educação sanitária deve ser parte integrante, ativa e funcional de qualquer programa sanitário (MacDiarmid, 1994; Sawyer, 1996; Ragan, 2002). É difícil conceber o sucesso de um programa

sanitário sem um intensivo e constante trabalho de educação sanitária.

A difusão dos conhecimentos sobre a brucelose, suas perdas econômicas, riscos para a população animal e humana, métodos diagnósticos, vacinas e estratégias de controle entre todas as pessoas que participam da cadeia produtiva da carne e do leite é fundamental para o sucesso de um programa de controle da doença.

Quanto mais conhecimentos o proprietário e os vaqueiros e tratadores possuírem sobre o assunto, maior será seu envolvimento nas atividades do programa, identificando a importância das ações de cada um e de sua integração no controle da doença. Isto ajudará também na formação de uma visão crítica sobre as medidas tomadas, o que poderá auxiliar na revisão das medidas dentro do rebanho e identificação de pontos críticos no programa instituído. Além disto, facilitará a compreensão das mudanças de estratégias que vierem a ser necessárias e de possíveis problemas que venham a surgir durante a execução do programa.

12. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DA BRUCELOSE BOVINA

Para que um programa de controle da brucelose possa ter êxito, culminando com a erradicação da doença de um rebanho, região, estado ou país, é necessário o esforço conjunto de todos os envolvidos na produção de bovinos, desde o vaqueiro e o proprietário, passando pelo médico veterinário responsável pelo programa, até os serviços de defesa sanitária animal e a indústria de produtos de origem animal.

Somente uma boa sintonia entre as várias atividades poderá resultar favoravelmente no controle e erradicação da brucelose bovina. Desta forma, além do emprego de estratégias e técnicas corretas, é necessário haver uma ampla divulgação de conhecimentos sobre a doença e que os vários setores, tanto governamentais quanto privados, apresentem os estímulos necessários para a evolução do programa rumo à erradicação da brucelose bovina no Brasil.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2 ed. Washington: Organization Panamericana de la Salud, 989 p. 1986.
- ADAMS, G.L. Development of live *Brucella* vaccines. In: ADAMS, G.L.. *Advances in Brucellosis Research*. Texas A&M University Press, p. 251-276, 1990.
- ALEXANDER, B.; SCHNURRENBERGER, P.R.; BROWN, R.R. Number of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows. *Vet. Record*, v.108, p.500, 1981.
- ALTON, G.G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Australian Veterinary Journal*, v. 54, p.551-557, 1978.
- ASHFORD, D.A.; PIETRA, J.; LINGAPPA, J.; WOODS, C.; NOLL, H.; NEVILLE, B.; WEYANT, R.; BRAGG, S.L.; SPIEGEL, R.A.; TAPPERO, J.; PERKINS, B.A. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v.22, p.3435-3439, 2004.
- BAUMGARTEN, D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Vet. Microbiol.* V.90, p.63-69, 2002.
- HENKEN A.M., GRAAT, E. A. M.; CASAL, J.. Measurement of disease frequency. IN: NOORDHUIZEN, J.P.T.M., FRANKENA, K., van der HOOFD, C.M.; GRAAT, E.A.M. APPLICATION OF QUANTITATIVE METHODS IN VETERINARY EPIDEMIOLOGY, 1997. Wageningen Pers, The Netherlands. p. 63-98
- JONES, F.M.; HOOPER, J.A. *Brucella abortus* strain 19 calfhood vaccination - A Review. *Southwestern Veterinarian*, v. 29, p.219-225, 1976.
- BERNUÉS, A., MANRIQUE, E., MAZA, M.T. Economic evaluation of bovine brucellosis and tuberculosis eradication programmes in a mountain area in Spain. *Prev. Vet. Med.*, v. 30, p. 137 - 149, 1997.
- BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 6 de 8 de janeiro de 2004 Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 jan. 2004, Seção 1, p. 6 - 10.
- BUNDLE, D.R.; CHERWONOGRODZKY, J.; CAROFF, M.; PERRY, M.B. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, v.138, p.92-98, 1987.
- CHEVILLE, N.F.; JENSEN, A.E.; HALLING, S.M.; TATUM, F.M.; MORFITT, D.C.; HANNAGER, S.G.; FRERICHS, W.M.; SCHURIG, G.G. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.1881-1888, 1992.
- CRAWFORD, R.P., HUBER, J.D., ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, p. 131-151, 1990.
- ENRIGHT, F.M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection of domestic animals. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 301-320, 1990.

- KO, J.; SPLITTER, G. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, p.65-78, 2003.
- LUNA-MARTÍNEZ, E.J.; MEJÍA TÉRAN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet. Microbiol.* V.90, p.19-30, 2002.
- MacMILLAN, A.P. Conventional serological tests. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 153-197, 1990.
- MacMILLAN, A.P. & STACK, J. Bovine Brucellosis. In: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 4 ed. Paris: Office International des Epizooties, p. 328 – 345, 2000.
- MacDIARMID, S.C. Bovine brucellosis eradication in New Zealand. *Surveillance*, v. 21, p. 18 – 21, 1994.
- McEWEN, A.D. The virulence of *Brucella abortus* for laboratory animals and pregnant cattle. *Vet. Record*, v.52, p.97-106, 1940.
- MANTHEI, C.A. Summary of controlled research with strain 19. In: *Proc. 63rd Annu. Meet. Livestock Sanit. Assoc.*, p.91-97, 1959.
- MORENO, E. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.* V.90, p.31-38, 2002.
- MORIYÓN, I.; GRILLÓ, M.J.; MONREAL, D.; GONZÁLEZ, D.; MARÍN, C.; LÓPEZ-GOÑI, I.; MAINAR-JAIME, R.C.; MORENO, E.; BLASCO, J.M. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, v. 35, p. 1-38, 2004.
- NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p.283-299, 1990.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v.90, p. 447-459, 2002.
- OLSEN, S.C.; BRICKER, B.; PALMER, M.V.; JENSEN, A.E. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficiency. *Res. Vet. Sci.*, v.66, p.101-105, 1999.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité mixto FAO/OMS de expertos en Brucellosis. Sexto informe. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 149p. 1986. (Serie de Informes Técnicos 740)
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L.; OLSEN, S.; SCHURIG, G.; LAGE, A.P. Efficacy of RB51 in adult cattle against experimental brucellosis. In: Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, XIX. Buenos Aires: Federación Veterinaria Argentina, Panamerican Veterinary Sciences Association, 2004. p.
- RAGAN, V. E. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet. Microbiol.* V. 90, p. 11-18, 2002.
- RIVERA, A.S.; RAMIREZ, C.M.; LOPETEGUI, P.I. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. *Vet. Microbiol.* V.90, p.45-53, 2002.
- RUSSEL, A.D., YARNYCH, V.S., KOULIKOVSKII, A.V. ed *Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases*. Geneva: World Health Organization, (WHO/VPH/84.4), 62p. 1984.
- SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v.28, p.28-171, 1991.
- SCHURIG, G.G., SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v.90, p. 479-496, 2002.
- STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v. 44, p. 223-235, 1995.
- STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C.; PALMER, M.V. et al., *Brucella abortus* strain RB51: A new Brucellosis vaccine for cattle. *Comp. Cont. Educ. Vet. Prac.*, v.19, p.766-774, 1997
- SAWYER, J.C. The brucellosis affected dairy herd and the program veterinarian. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 19, p. 191 – 197, 1996.
- THOEN, C.O., ENRIGHT, F., CHEVILLE, N.F. *Brucella*. In: R.L. GYLES, C.L. & THOEN, C.O. ed. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, p.236-247, 1993.
- VARGAS, F.J. Brucellosis in Venezuela. *Vet. Microbiol.* V.90, p.39-44, 2002.
- VEMULAPALLI, R.; HE, Y.; BUCOLLO, L.S.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURIG, G.G. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infection and Immunity*, v.68, p3927-3932, 2000.
- VEMULAPALLI, R.; HE, Y.; SRIRANGANATHAN, N.; BOYLE, S.M.; SCHURIG, G.G. Brucella abortus RB enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Vet. Microbiol.*, v.90, p. 553, 2002.
- WINTER, A.J.; SCHURIG, G.G.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N.; BEVINS, J.; ENRIGHT, F.M.; ELZER, P.H.; KOPEC, J. Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitae* and *Brucella suis* biovar 4. *Am. J. Vet. Res.*, v. 67, p.677-683, 1996.
- WRAY, C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Vet. Bull.*, v. 45, p. 543 - 550, 1975.

INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS*

Renato de Lima Santos¹
Fernando Padilla Poester²
Andrey Pereira Lage³

1. INTRODUÇÃO

A *Brucella ovis* foi inicialmente reconhecida no início da década de 50 na Nova Zelândia e na Austrália como um agente bacteriano associado a aborto e epididimite em ovinos. Inicialmente o organismo foi designado como "Brucella-like" e, logo em seguida, classificado como *Brucella ovis*. Desde então o organismo tem sido isolado em vários países (Burgess, 1982), sendo considerada uma das causas mais importantes de infertilidade em ovinos, com impacto econômico bastante significativo (Carpenter et al., 1987).

A *B. ovis* é uma espécie rugosa estável que morfologicamente se caracteriza como cocobacilo de, aproximadamente, 0,5-0,7 por 0,6-1,5 µm, geralmente solitário,

podendo raramente formar cadeias curtas. O organismo não tem motilidade, não forma endosporos e não apresenta coloração bipolar (Burgess, 1982). *B. ovis* causa infecção crônica clínica ou subclínica em ovinos caracterizada por epididimite, orquite e infertilidade nos machos e, ocasionalmente, aborto nas fêmeas (Ficapal et al., 1998). É uma das duas espécies do gênero *Brucella* que não tem potencial zoonótico

Embora o termo epididimite contagiosa ovina possa ser encontrado na literatura como sinônimo de infecção por *B. ovis*, este é um equívoco, uma vez que vários outros organismos podem causar manifestações clínicas e lesões semelhantes à *B. ovis*, como o *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis* e *Arcanobacterium pyogenes*, entre outros (Watt, 1978; DeLong et al., 1979; Burgess, 1982; Walker et al., 1986). Embora *B. ovis* seja o agente mais comum de epididimite em carneiros sexualmente maduros em reprodução, outros agentes são mais comuns em carneiros jovens (Bulgin & Anderson, 1983; Bagley et al., 1985; Walker et al., 1986).

2. EPIDEMIOLOGIA

Carneiros sexualmente maduros são mais suscetíveis do que animais jovens (Walker et al., 1986). Entretanto, a infecção por *B. ovis* pode ocorrer em animais de até quatro meses de idade (Burgess et al., 1982) e há relatos de infecção com características epizoóticas em rebanhos de carneiros jamais utilizados para reprodução e sem contato com carneiros em reprodução (Bulgin, 1990a). A transmissão natural aparentemente se dá

por infecção através de membranas mucosas, mas as vias de transmissão natural da doença ainda não são completamente conhecidas (Paolicchi, 2001). A transmissão venérea certamente é importante quando um carneiro susceptível copula uma ovelha que teve previamente, no mesmo período de estro, cópula com um carneiro infectado. Neste contexto, a fêmea atua de forma semelhante a um vetor mecânico para a transmissão da doença. Além disso, pode ocorrer transmissão por contato direto entre carneiros mantidos na mesma baia por período prolongado (Brown et al., 1973).

A infecção por *B. ovis* tem distribuição mundial em todas as áreas onde a ovinocultura tem importância econômica, com exceção da Grã-Bretanha (Burgess, 1982). A prevalência em rebanhos varia de 9,1 a 46,7% em áreas de criação intensiva de ovinos (Sergeant, 1994). A soroprevalência em carneiros dentro de rebanhos positivos varia de 2,1 a 67% (Sergeant, 1994; Torres et al., 1997 Robles et al., 1998), com menor soroprevalência em carneiros da raça Merino (Sergeant, 1994). No Brasil, um levantamento realizado em 76 rebanhos no Rio Grande do Sul demonstrou soroprevalência média em carneiros de rebanhos positivos de 13,4% (variando de 6,9 a 50%), com aumento da soroprevalência em animais mais velhos e sem predisposição racial definida (Magalhães Neto & Gil-Turnes, 1996). Em uma outra propriedade gaúcha foi encontrada prevalência de 9,79% (Cardoso et al., 1989). Em um levantamento sorológico realizado no Estado de São Paulo, envolvendo 18 rebanhos em 15 municípios, não foi encontrada evidência sorológica da

infecção por *B. ovis* (Marinho & Mathias, 1996).

Em condições naturais a infecção natural por *B. ovis* é quase totalmente restrita a ovinos. Contudo, na Nova Zelândia, foi demonstrado que carneiros infectados podem transmitir *B. ovis* para cervídeos (*Cervus elaphus*) mantidos no mesmo piquete (Ridler et al., 2000).

3. MANIFESTAÇÃO CLÍNICA

Experimentalmente, a infecção por *B. ovis* pode ser estabelecida após exposição de ovinos susceptíveis à cultura pura ou sêmen contaminado por via prepucial, retal e nasal (Laws et al., 1972; Plant et al., 1986). Nestes casos o percentual de animais que desenvolvem evidências sorológicas, bacteriológicas ou clínico-patológicas de infecção variou de 68 a 87,8%.

A palpação escrotal em carneiros tem demonstrado ser uma técnica de utilidade no diagnóstico da epididimite ovina. A identificação de número elevado de machos que, à palpação, demonstrou epididimite uni ou bilateral, sugere a possibilidade de infecção no rebanho (Lawrence, 1961). No entanto, este procedimento tem eficácia limitada na medida em que existem animais que, embora infectados, não desenvolvam lesões; além disso, as lesões que evoluem para cronicidade podem não ser perceptíveis à palpação; ou ainda, pelo fato de existirem outras causas, infecciosas ou não, capazes de provocar lesões no epidídimo (McGowan & Schultz, 1956; Hughes & Claxton, 1968).

¹ Méd.Vet., PhD, Prof. Adj. DCCV,
Esc. de Vet. da UFMG. r.santos@vet.ufmg.br

² Méd. Vet., MSc, Doutorando. LARA-MG,
MAPA, Brasil

³ Méd. Vet., MMV, DSc, Prof. Adj. DMVP da
Esc. Vet., da UFMG.

A alteração clínica observada com maior freqüência ocorre na cauda do epidídimo, na maioria dos casos é unilateral e é caracterizada por consistência firme, na maioria dos casos sem aumento considerável de volume. Em alguns casos pode haver envolvimento da cabeça e do corpo do epidídimo (Cameron & Lauerman, 1976; Blasco, 1990). Contudo, conforme salientado acima, o diagnóstico clínico de epididimite por *B. ovis* tem eficiência limitada. Foi demonstrado que somente 36,12 a 39,7% dos carneiros com sorologia positiva, apresentavam lesões palpáveis nos epidídimos (Hughes & Claxton, 1968; Cardoso et al., 1989). Esse percentual cai para 36,4% se considerados os carneiros com bacteriologia positiva (Hughes & Claxton, 1968). *B. ovis* não é isolada regularmente do sêmen de animais infectados experimentalmente ao longo do curso da infecção (Laws et al., 1972).

Animais infectados e que apresentam lesões palpáveis, com alguma freqüência retornam à condição normal em algumas semanas, apesar do sêmen ser de baixa qualidade, com baixa na fertilidade, o que dificulta o diagnóstico baseado apenas na palpação do conteúdo escrotal (Cameron & Lauerman, 1976). Além disso, um número considerável de animais pode persistir eliminando o organismo no sêmen por períodos prolongados, sem manifestar nenhuma alteração detectável por palpação dos epidídimos e testículos (Hughes & Claxton, 1968). Esses animais assintomáticos que eliminam o organismo no sêmen podem ser subférteis ou apresentarem fertilidade normal. Isso favorece a disseminação da infecção no rebanho, uma vez que, freqüentemente, é utilizada a relação macho:fêmea mais elevada do que o mínimo necessário, o que

faz com que os animais subférteis sejam mascarados e o problema não seja detectado no rebanho até que o número de animais infectados tenha aumentado consideravelmente.

A infecção por *B. ovis* resulta em perda significativa da qualidade espermática dos carneiros. Ocorre diminuição do número de espermatozoides no ejaculado, diminuição da motilidade e aumento da taxa de patologias espermáticas (Cameron & Lauerman, 1976), incluindo cabeças isoladas e defeitos de peça intermediária e de cauda (Kimberling et al., 1986). O comprometimento da qualidade espermática é maior quanto mais acentuadas forem as lesões no epidídimo (Cameron & Lauerman, 1976). Cardoso et al. (1989) estudaram as alterações espermáticas em um rebanho ovino do Rio Grande do Sul e encontraram, entre os animais sorologicamente positivos, diminuição significativa da motilidade espermática e aumento significativo das patologias espermáticas, quando comparados aos carneiros soronegativos. Além disso, 19,45% dos animais soropositivos apresentaram leucócitos no ejaculado.

Com base na avaliação de alterações espermáticas, Kimberling et al. (1986) fazem as seguintes recomendações práticas para o controle da doença:

- A pesquisa de leucócitos no ejaculado deve ser adotada como rotina na avaliação andrológica de ovinos;
- as amostras de sêmen contendo leucócitos ou com mais de 30% de cabeças isoladas devem ser processadas para isolamento bacteriológico de *B. ovis*;

- em rebanhos sabidamente positivos para *B. ovis* onde não seja possível o isolamento do agente do sêmen, somente a presença de leucócitos no ejaculado deve ser utilizada como critério para descarte dos machos, mas carneiros soronegativos e sem leucócitos no ejaculado podem ser portadores da infecção e eliminar o organismo no sêmen (Bulgin, 1990b).

Na ovelha, a principal consequência da infecção por *B. ovis* é o aborto ou nascimento de cordeiros fracos. A taxa de aborto pode chegar a 39% em ovelhas gestantes inoculadas experimentalmente, sendo que o aborto ocorre em torno de 30 dias após a inoculação (Meinershagen et al., 1974), embora possa não ocorrer abortos após inoculação experimental em ovelhas gestantes (Muhammed et al., 1975). Além de abortos, infecções experimentais resultam em até 29% de nascimento de cordeiros fracos com morte perinatal ou natimortos (Grilló et al., 1999).

O período de maior susceptibilidade ao aborto induzido pela infecção por *B. ovis* é em torno de 30 dias após o início da gestação (Osburn & Kennedy, 1966). Inoculação experimental de ovelhas no momento da cópula, por via endovenosa ou intravaginal, resulta em maior taxa de retorno ao estro e maior taxa de mortalidade embrionária e fetal (Hughes, 1972). O comprometimento do desempenho reprodutivo da ovelha nestes casos provavelmente se deve ao desenvolvimento de vaginite e endometrite devido à infecção por ocasião da cópula (Homse et al., 1994). Nesses casos, o organismo é isolado principalmente do trato genital e dos linfonodos regionais e,

com freqüência baixa, do baço (Homse et al., 1994; Marco et al., 1994). Após infecção experimental de ovelhas gestantes, ocorre bacteremia transitória ou intermitente, e o organismo pode ser isolado do sangue ou de outros tecidos até 98 dias após a inoculação (Muhammed et al., 1975).

Apesar de ovelhas infectadas eliminarem continuamente *B. ovis* pelo leite, aparentemente a ingestão do leite não resulta em transmissão para os cordeiros lactentes. Além disso, a capacidade de transmissão da ovelha para o carneiro reprodutor através da cópula aparentemente é bastante limitada (Grilló et al., 1999). Por isso, ovelhas infectadas são freqüentemente negligenciadas sob o ponto de vista de controle da doença, mas há evidências de que a infecção na fêmea possa ter papel bastante significativo comprometendo a erradicação da doença (Marco et al., 1994). Ovelhas infectadas podem permanecer soropositivas por mais de três anos, indicando infecção persistente (Hughes, 1972).

Caprinos são susceptíveis à infecção experimental e podem eliminar *B. ovis* no sêmen. Embora a importância da doença nessa espécie não seja bem definida, o fato de caprinos serem susceptíveis à infecção pode ter algum significado clínico quando estes animais são mantidos em contato direto com ovinos (Burgess et al., 1985). Outras espécies suscetíveis incluem cervídeos das espécies *Cervus elaphus* e *Odocoileus virginianus* (Barron et al., 1985; Ridler & West, 2002), podendo resultar em alterações seminais no caso do *Cervus elaphus* (Ridler & West, 2002) e carneiros selvagens originários da Sardenha e Córsega (*Ovis musimon*), que apresentam

soroconversão, apesar de serem aparentemente resistentes à doença (Cerri et al., 2002). Dentre as espécies de animais de laboratório, o gerbil (*Meriones unguiculatus*) é o que tem maior potencial para ser utilizado como modelo experimental para a infecção por *B. ovis* (Cuba-Caparaó & Myers, 1973).

4. PATOGÊNESE E LESÕES

A *B. ovis*, à semelhança de outros organismos do gênero, tem a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos, o que favorece a persistência do agente nos tecidos (Paolicchi, 2001). Após penetração, geralmente através da mucosa, a *B. ovis* coloniza os linfonodos regionais, produz bacteremia e finalmente coloniza o trato genital por volta de 30 dias após a infecção (Biberstein et al., 1964). Os fatores que determinam o tropismo da *B. ovis* para o trato genital não são conhecidos, mas tal tropismo não está relacionado ao eritritol, que é um fator de tropismo para outras espécies do gênero *Brucella* (Redwood & Corbel, 1983).

Em um estudo das alterações do sistema genital de 845 carneiros descartados do programa de reprodução em 17 fazendas australianas, a epididimite foi a alteração mais freqüentemente observada dentre as patologias que tem importância clínica, sendo que a maioria dos animais que apresentavam epididimite eram também sorologicamente positivos para *B. ovis* (Foster et al., 1989). No carneiro, as lesões resultantes da infecção por *B. ovis*, com confirmação bacteriológica, se concentram principalmente na cauda do epidídimo, mas também na ampola do ducto deferente e na glândula vesicular, sendo que em 70% dos casos a lesão é bilateral (Searson,

1987). Após inoculação experimental de cultura de *B. ovis* diretamente no epidídimo, observa-se intenso infiltrado inflamatório misto, constituído por linfócitos e neutrófilos detectável aos quatro dias após a inoculação. Aos oito dias após a inoculação, além de infiltração de células inflamatórias no tecido conjuntivo de sustentação e no epitélio epididimário, há acúmulo de grande quantidade de neutrófilos no lúmen do ducto epididimário.

Um achado interessante é que a imunização prévia com uma bacterina de *B. ovis* tende a agravar estas lesões (Rahaley & Dennis, 1984). As lesões iniciais progridem com fibrose intersticial, degeneração do epitélio epididimário e, eventualmente, ruptura do ducto epididimário com extravasamento de espermatozoides para o interstício, com o desenvolvimento de granuloma espermático (Paolicchi, 2001). Segundo Blasco (1990), a atrofia testicular e um grau variável de aumento de volume da cauda do epidídimo são características de infecção crônica. O epidídimo afetado tem consistência firme e ao corte apresenta superfície de coloração esbranquiçada devido proliferação de tecido conjuntivo (Fig. 1).

A interrupção da espermatogênese pode resultar em atrofia testicular. As vesículas seminais podem apresentar aumento de volume, com os dutos preenchidos por líquido. As glândulas bulbo-uretrais, a próstata e as ampolas seminais normalmente não apresentam alterações significativas. Microscopicamente, o epidídimo afetado tem edema intersticial, fibrose e infiltração perivasculares de linfócitos e células plasmáticas (Fig. 2).

Granulomas espermáticos compostos de espermatozoides extravasados e recobertos por linfócitos, células epitelioides e células gigantes são achados freqüentes. Alterações macroscópicas geralmente são observadas somente nos epidídimos após a formação de granuloma espermático (Fig.3), sendo que na glândula vesicular e na ampola do ducto deferente somente são observadas lesões microscópicas caracterizadas pelo acúmulo de células inflamatórias (Foster et al., 1987).



Figura 1. Carneiro. Aumento acentuado de volume da cauda do epidídimo com vários nódulos amarelos. Epididimite crônica por *Brucella ovis*. (Cortesia do Prof. David Driemeier, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

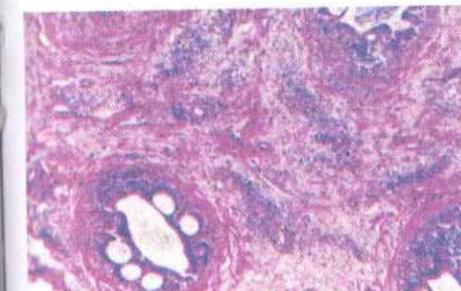


Figura 2. Carneiro. Epidídimo com infiltrado inflamatório no interstício, predominantemente perivasculares e cistos intra-epiteliais. Epididimite por *Brucella ovis*. (Cortesia do Prof. Franklin Riet-Correa, Universidade Federal da Paraíba).

Como consequência da formação de granuloma espermático, carneiros com infecção por *B. ovis* freqüentemente desenvolvem reação imune antiespermática, que persiste mesmo após tratamento seguido de cura bacteriológica e, portanto, pode ter significado na patogênese da infertilidade associada à infecção por *B. ovis* (Paolicchi et al., 2000). É importante ressaltar que as lesões descritas acima não são específicas para infecção por *B. ovis*.

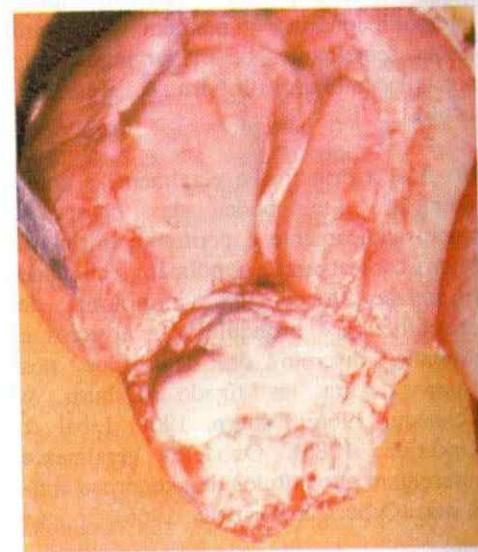


Figura 3. Carneiro. Superfície de corte da cauda do epidídimo, granuloma espermático. Epididimite crônica por *Brucella ovis*. (Cortesia do Prof. Franklin Riet-Correa, Universidade Federal da Paraíba).

A inoculação experimental intravaginal de ovelhas não-gestantes resulta em vaginite e endometrite (Homse et al., 1994) e, na

ovelha gestante, a infecção por *B. ovis* resulta em placentite, com lesões mais acentuadas nas regiões intercotiledonárias do que nos placentomas. Macroscopicamente, há acúmulo de exsudato fibrinoso amarelado sobre o córion intercotiledonário. Do ponto de vista histológico, além do acúmulo multifocal de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, podem ser observados focos de necrose e organismos livres ou intracelulares, principalmente no trofoblasto (Molello et al., 1963; Libal & Kirkbride, 1983). Apesar das lesões serem mais acentuadas nas regiões intercotiledonárias, também ocorrem lesões semelhantes de menor intensidade nos placentomas (Osburn & Kennedy, 1966).

No feto, a principal e geralmente a única alteração que pode ser observada macroscopicamente é peritonite fibrinosa. Microscopicamente, o pulmão fetal pode apresentar focos de infiltração de neutrófilos nos bronquíolos e alvéolos e acúmulo discreto de neutrófilos nos espaços porta no fígado (Osburn & Kennedy, 1966; Osburn, 1968; Libal & Kirkbride, 1983). Os fetos geralmente apresentam altos títulos de anticorpos anti-*B. ovis* (Osburn & Kennedy, 1966).

Sob o ponto de vista de diagnóstico diferencial, cabe ressaltar que, em um estudo comparativo, *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* apresentaram maior potencial patogênico para indução de aborto em ovelhas gestantes quando comparadas com *B. ovis*. Tanto *B. abortus* quanto *B. melitensis* induzem lesões mais severas no placentoma da ovelha gestante, enquanto a *B. ovis* tende a causar placentite principalmente nas áreas

intercotiledonárias (Collier & Molello, 1964). Importante ressaltar que *B. abortus* e, principalmente, *B. melitensis* são agentes zoonóticos. Felizmente não há evidências da presença de *B. melitensis* no Brasil.

5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da epididimite dos carneiros é realizado pela associação de exames clínicos, bacteriológicos e sorológicos. Recentemente, novos procedimentos têm sido avaliados, envolvendo a detecção de DNA específicos, pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) com resultados bastante promissores. Os principais métodos laboratoriais de diagnóstico disponíveis estão detalhados abaixo.

5.1. Exame bacteriológico

O isolamento da *B. ovis* do sêmen permite o diagnóstico definitivo da enfermidade. Conforme mencionado na introdução, é importante levar em conta que outros microrganismos também podem ser responsáveis por epididimite e devem ser levados em consideração no diagnóstico diferencial com a *B. ovis*. Entre os agentes que podem provocar epididimite em ovinos destacam-se:

- *Actinobacillus seminis*
- *A. lignieresii*
- *Corynebacterium pseudotuberculosis*
ovis
- *Arcanobacterium (Corynebacterium)*
pyogenes
- *Histophilus ovis*
- *Haemophilus spp.*

Em alguns países como a Grã-Bretanha, *Chlamidia* e *Toxoplasma* estão também envolvidos (Blasco, 1990).

Trabalhos têm revelado que animais com lesões de epidídimo e com reação sorológica positiva não apresentaram a bactéria no sêmen e, em contrapartida, outros animais, apesar de não reagirem às provas sorológicas, eliminavam a bactéria no sêmen (Myers, 1973). Em função da eliminação da bactéria pelo sêmen ser intermitente, recomenda-se semear três ou quatro amostras coletadas com uma semana de intervalo (Blasco, 1983). Esta coleta é geralmente feita por meio de eletroejaculador e devem ser tomadas precauções assépticas durante a coleta, pois além de contaminantes ambientais, existe a flora saprófita do prepúcio que inibe o crescimento da *B. ovis*. Para minimizar estes inconvenientes recomenda-se o uso de um meio seletivo como o de Thayer-Martin modificado (Brown et al., 1971; Blasco, 1990). Este meio é composto por um meio básico (*GC medium*), ao qual se adiciona 10% de soro estéril e os antibióticos nitrofurantoína e inibidor VCN (vancomicina, colistina, nistatina). As placas são incubadas por até uma semana em atmosfera contendo 5-10% de CO₂. A identificação da bactéria é feita levando-se em conta a exigência de soro e CO₂ para crescimento, morfologia bacteriana e presença de colônias rugosas, constatadas nas provas de acriflavina e cristal violeta e ainda por aglutinação com soro anti-R.

5.2. Exame sorológico

Pelo fato da *B. ovis* apresentar morfologia colonial permanentemente rugosa, a sua parede celular difere das brucelas lisas quanto à constituição do lipopolisacarídeo, pois carece da cadeia O, característica presente apenas nas brucelas lisas (Diaz et

al., 1967). Como consequência, os anticorpos produzidos pela *B. ovis* não são detectados pelos mesmos抗ígenos empregados nas provas convencionais (Alton et al., 1988).

Várias provas sorológicas têm sido usadas no diagnóstico da epididimite ovina. Muitas, no entanto, foram abandonadas, ou por serem pouco práticas, ou por apresentarem baixa sensibilidade e especificidade. Dentre as mais usadas destacam-se a fixação do complemento, a gel difusão e a ELISA indireta (Clapp, 1955; Myers et al., 1972; Gall et al., 2003).

A prova de fixação do complemento (FC) tem sido o teste usado com maior freqüência, especialmente em programas de erradicação na Austrália e Nova Zelândia. A especificidade desta prova depende fundamentalmente do modo de extração do antígeno. Os抗ígenos totais obtidos por ultra-som, tiveram o seu uso interrompido por apresentarem reações cruzadas com outras brucelas e a utilização de抗ígenos celulares completos origina reações cruzadas de *B. ovis* com outras amostras rugosas de *Brucella* spp. (Diaz et al., 1967; Myers et al., 1972). A utilização de抗ígenos solúveis obtidos por aquecimento e posterior centrifugação de suspensões salinas de *B. ovis* (HS), melhoraram bastante a especificidade do teste (Myers & Siniuk, 1970). Outros fatores, como a temperatura da prova (a quente ou a frio) e o tempo de incubação também influenciam na sensibilidade e especificidade deste teste (Blasco, 1990).

Um estudo comparativo entre diversas provas sorológicas realizado por Spencer & Burgess (1984), executado com抗ígeno solúvel (HS), revelou que a FC apresentou

sensibilidade similar à prova de gel difusão, mas, ao mesmo tempo, sensibilidade menor que a obtida no teste de ELISA com o mesmo antígeno.

A FC, apesar de ser ainda usada em vários países em programas de controle e erradicação, tem contra si algumas desvantagens como:

- Complexidade de execução;
- necessidade de inativação do soro por calor;
- atividade anticomplementar de alguns soros;
- dificuldade de se usar soro hemolisado;
- fenômeno de prozona (Blasco, 1990).

Em função disto, a prova de imunodifusão em gel (GD) tem substituído a FC na rotina. O método, adaptado por Myers & Sinjuk (1970), apresenta boa correlação com os resultados da FC (Spencer & Burgess, 1984). Esta correlação é explicada porque os anticorpos detectados na gel difusão são do tipo IgG, o mesmo tipo de anticorpos identificados na FC (Myers et al., 1972). As vantagens do uso desta técnica em relação à FC são o custo operacional mais baixo, a menor complexidade, a menor necessidade de capacitação técnica e a maior possibilidade de realização a campo ou em laboratórios com poucos recursos materiais (Blasco, 1983). O grande inconveniente é a falta de padronização do teste, mas quando as duas provas são usadas em conjunto, detectam um número maior de animais positivos do que quando usadas isoladamente (Myers, 1973; Poester & Vaz, 1977). Segundo Blasco (1990), a GD apresenta

sensibilidade aumentada ou similar à da FC desde que algumas precauções sejam tomadas. Estas precauções envolvem a titulação de cada lote liofilizado do antígeno produzido, frente a vários soros positivos e o preparo do gel com solução hipertônica de NaCl (10%).

Testes imunoenzimáticos têm sido usados para o diagnóstico da epididimite ovina por diversos autores (Spencer & Burgess, 1984, Vigliocco et al., 1997; Gall et al., 2003). As principais diferenças entre as técnicas usadas são os variados substratos e抗ígenos empregados. Comparações entre GD, FC e ELISA têm revelado que individualmente o teste de ELISA apresentou os melhores resultados. Alguns soros com resultados positivos na GD apresentaram resultados negativos na ELISA, entretanto a combinação da GD com ELISA revelou a melhor sensibilidade sem alterar a especificidade (Marín, 1989a).

Recentes modificações introduzidas no teste de ELISA por Gall et al. (2003), resultaram em sensibilidade de 96,3% e especificidade de 99,6%. Estas modificações incluíram o uso de um antígeno lipopolissacárido rugoso purificado (sem proteínas de membrana externa), adsorvido a placas de baixa capacidade de ligação (*low binding*), não tratadas e um soro composto de um anticorpo monoclonal murino específico contra um epitopo de IgG₁ bovino (o qual tem reação cruzada com IgG ovina), conjugado à peroxidase. Segundo estes autores, um teste de ELISA com estas características, poderia ser de utilidade em testes para comércio internacional de animais em substituição aos testes de gel difusão e fixação do complemento.

5.3. Métodos moleculares

Recentemente um teste de PCR foi avaliado como um teste adicional no diagnóstico da epididimite ovina, especialmente em amostras de sêmen muito contaminado ou quando estiverem presentes poucas bactérias. Este teste apresentou sensibilidade semelhante ao da cultura bacteriana (Manterola et al., 2003).

6. VACINAÇÃO, CONTROLE E ERRADICAÇÃO

Em países com alta prevalência da enfermidade, programas de controle baseados em vacinação, seguidos de teste e sacrifício, revelaram ser práticos e econômicos. Diversos tipos de vacinas foram usados no passado, sendo as primeiras elaboradas com bacterinas em diferentes adjuvantes como salina em óleo ou hidróxido de alumínio, todas de reduzida eficácia (Buddle, 1954).

A vacinação simultânea da amostra 19 com bacterinas preparadas com *B. ovis* apresentou boa proteção contra a infecção. No entanto, carneiros vacinados passaram ou a eliminar a amostra 19 no sêmen, ou manifestaram epididimite e ainda permaneceram sorologicamente positivos, o que interfere com o diagnóstico sorológico (Blasco, 1990).

Segundo diversos ensaios, vacinas preparadas com a amostra atenuada Rev 1 de *Brucella melitensis* é provavelmente o melhor produto disponível contra a epididimite por *B. ovis*, conferindo imunidade em mais de 80% dos animais vacinados (Blasco et al., 1987; Marín et al., 1990). Tem sido usada extensivamente em países que convivem com *B. ovis* e *B.*

melitensis. Entretanto, em países onde a *B. melitensis* não é problema, esta vacina não tem sido aceita e na maioria dos casos está proibida. A principal razão é que os animais permanecem sorologicamente positivos, o que interfere com os programas de controle, além de ser patogênica para o homem (Burgess, 1982).

A vacina elaborada com a amostra rugosa RB51 de *Brucella abortus*, embora tenha apresentado resultados promissores quando aplicada em camundongos (Jiménez de Bagüés et al., 1994), revelou não conferir imunidade quando testada em carneiros (Jiménez de Bagüés et al., 1995). Da mesma forma, a amostra 2 de *Brucella suis* também não ofereceu uma boa alternativa de vacinação (Blasco et al., 1993).

Recentes estratégias para a obtenção e produção de抗ígenos e novas maneiras de se administrar e apresentar esses抗ígenos para as células do sistema imune têm sido pesquisadas. Extratos salinos de *B. ovis* são compostos por uma mistura complexa de lipopolissacárido rugoso (R-LPS) e proteínas de membrana externa (OMPs), especialmente as pertencentes ao grupo 3, no qual se enquadram as chamadas Omp25 (25kD) e Omp31 (31kD). Preparações elaboradas com mutantes deficientes em Omp25 ou Omp31, sozinhas ou associadas ao R-LPS, demonstraram boas perspectivas de imunização contra *B. ovis* quando testadas em camundongos (Edmonds et al., 2002; Estein et al., 2003). Sistemas controlados de apresentação de抗ígenos, onde são usadas micropartículas de poliéster, têm sido recentemente pesquisados com o objetivo de estimular uma boa resposta humoral pela produção de anticorpos opsonizantes, associada à indução de uma sólida resposta do tipo Th1

(Murillo et al, 2002). Estas vacinas, no entanto, estão em fase experimental e em função do seu alto custo de produção ainda podem demorar a serem usadas em larga escala.

Embora o controle tradicional seja baseado no descarte de carneiros infectados, o tratamento de 12 carneiros, experimentalmente infectados, com oxitetraciclina de longa duração isoladamente e 12 carneiros com oxitetraciclina em associação com estreptomicina, resultou em cura bacteriológica em 33,3 e 91,6% dos carneiros, respectivamente (Marín et al., 1989). Carneiros eliminando *B. ovis* no sêmen, mas sem alterações palpáveis nos epidídimos, responderam com 78 e 89% de cura bacteriológica, quando submetidos ao tratamento com oxitetraciclina por 15 dias associada à estreptomicina por 7 dias (9 carneiros tratados) ou oxitetraciclina mais estreptomicina por 7 dias (9 carneiros tratados), respectivamente (Dargatz et al., 1990).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTON, GG; JONES, LM; ANGUS, RD; VERGER, JM. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Paris : INRA, 1988. 190p.
- BAGLEY, CV; PASKETT, ME; MATTHEWS, NJ; STENQUIST, NJ. Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.186, n.8, p.798-801, 1985.
- BARRON, SJ; KOCAN, AA; MORTON, RJ; THEDFORD, TR; MCCAIN, CS. Susceptibility of male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Brucella ovis* infection. *American Journal of Veterinary Research*, v.46, n.8, p.1762-1764, 1985.
- BIBERSTEIN, EL; MCGOWAN, B; OLANDER, H; KENNEDY, P. Epididymitis in ram. Studies on pathogenesis. *Cornell Veterinarian*, v.54, n.1, p.27-41, 1964.
- BLASCO, JM. *Brucella ovis*. In: Nielsen K.; Duncan, JR. ed. Animal Brucellosis. Boca Raton, CRC Press, p. 351-378, 1990.
- BLASCO, JM. La epididimitis contagiosa del morueco (infección por *Brucella ovis*) Revision bibliográfica. *Comunicaciones I.N.I.A.*, n.5, 47p., 1983.
- BLASCO, JM; MARÍN, CM; BARBERÁN, M; MORIYÓN, I; DIAZ, R. Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Veterinary Microbiology*, v.14, p.381-392, 1987.
- BLASCO, JM; MARÍN, CM; JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, MP; BARBERÁN, M. Efficacy of *Brucella suis* strain 2 vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, v.11, p.1291-1293, 1993.
- BROWN, GM; PIETZ, DE; PRICE, DA. Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. *Cornell Veterinarian*, v.63, p.29-40, 1973.
- BROWN, GM; RANGER, CR; KELLEY, DJ. Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *Cornell Veterinarian*, v.61, p.265-280, 1971.
- BUDGLE, M.B. Production of immunity against ovine brucellosis. *New Zealand Veterinary Journal*, v.2, p.99-109, 1954.
- BULGIN, MS; ANDERSON BC. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.182, n.4, p.372-374, 1983.
- BULGIN, MS. *Brucella ovis* epizootic in virgin ram lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.196, n.7, p.1120-1122, 1990a.
- BULGIN, MS. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.196, n.2, p.313-315, 1990b.
- BURGESS, GW; MCDONALD, JW; NORRIS, MJ. Epidemiological studies on ovine brucellosis in selected ram flocks. *Australian Veterinary Journal*, v.59, p.45-47, 1982.
- BURGESS, GW. Ovine contagious epididymitis : a review. *Veterinary Microbiology*, v.7, p.551-575, 1982.
- BURGESS, GW; SPENCER, TL; NORRIS, MJ. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, v.62, n.8, p.262-264, 1985.
- CAMERON, RDA; LAUERMAN JR., LH. Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. *Veterinary Record*, v.99, p.231-233, 1976.
- CARDOSO, MRI; COSTA, M; BORTOLOZZO, FP; FERNANDES, JCT. Alterações da morfologia espermática em carneiros naturalmente infectados pela *Brucella ovis*. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.17, p.39-48, 1989.
- CARPENTER, TE; BERRY, SL; GLENN, JS. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: computerized decision-tree analysis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.190, n.8, p.983-987, 1987.
- CERRI, D; AMBROGI, C; EBANI, VV; POLI, A; CAPPELLI, F; CARDINI, G; ANDREANI, E. Experimental *Brucella ovis* infection in mouflon (*Ovis musimon*). *Journal of Wildlife Diseases*, v.38, n.2, p.287-290, 2002.
- CLAPP, KH. A complement fixation test for the diagnosis of ovine brucellosis with special reference to epididymitis. *Australian Veterinary Journal*, v.31, p.27-28, 1955.
- COLLIER, JR; MOLELLO, JA. Comparative distribution of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis* in experimentally infected pregnant sheep. *American Journal of Veterinary Research*, v.15, p.930-934, 1964.
- CUBA-CAPARAÓ, A; MYERS, DM. Pathogenesis of epididymitis caused by *Brucella ovis* in laboratory animals. *American Journal of Veterinary Research*, v.34, n.8, p.1077-1085, 1973.
- DARGATZ, DA; SMITH, JA; KNIGHT, AP; FARIN, PW; KIMBERLING, CV. Antimicrobial therapy for rams with *Brucella ovis* infection of the urogenital tract. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.196, n.4, p.605-610, 1990.
- DELONG, WJ; WALDHAM, DG; HALL, RF. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and Eastern Oregon flocks. *American Journal of Veterinary Research*, v.40, n.1, p.101-102, 1979.
- DIAZ, R.; JONES, L.M.; WILSON, J.B. Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, v.93, p.1262-1268, 1967.
- EDMONDS, M.D.; CLOECKAERT, A.; ELZER, P.H. *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Veterinary Microbiology*, v.88, p.205-221, 2002.
- ESTEIN, SM; CASSATARO, J; VIZCAÍNO, N; ZYGMUNT, MS; CLOECKAERT, A; BOWDEN, RA. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in Balb/c mice. *Microbes and Infection*, v.5, p.85-93, 2003.
- FICAPAL, A; JORDANA, J; BLASCO, JM; MORIYÓN, I. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Research*, v.29, p.13-19, 1998.
- FOSTER, RA; LADDS, PW; BRIGGS, GD; HOFFMANN, D. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, v.64, n.8, p.248-250, 1987.
- FOSTER, RA; LADDS, PW; HOFFMANN, D; BRIGGS, GD. Pathology of reproductive tracts of Merino rams in north western Queensland. *Australian Veterinary Journal*, v.66, n.8, p.262-264, 1989.

GALL, D; NIELSEN, K; VIGLIOTTO, A; SMITH, P; PEREZ, B; ROJAS, X; ROBLES, C. Evaluation of an indirect-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminant Research*, v.48, p.173-179, 2003.

GRILLÓ, MJ; MARÍN, CM; BARBERÁN, M; BLASCO, JM. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Veterinary Record*, v.144, p.555-558, 1999.

HOMSE, AC; CASARO, AP; CAMPERO, CM; PAOLICCHI, F; TERZOLO, H. Infección experimental en ovejas por *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*, v.75, n.4, p.302-306, 1994.

HUGHES, KL; CLAXTON, PD. *Brucella ovis* infection. I. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. *Australian Veterinary Journal*, v.44, p.41-47, 1968.

HUGHES, KL. Experimental *Brucella ovis* infection in ewes. I. Breeding performance of infected ewes. *Australian Veterinary Journal*, v.48, p.12-17, 1972.

JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M; BARBERÁN, M; MARÍN, CM; BLASCO, JM. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, v.13, p.301-304, 1995.

JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, MP; ELZER, PH; JONES, SM; BLASCO, JM; ENRIGHT, FM; SCHURIG, GG; WINTER, AJ. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects Balb/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Infection and Immunity*, v.11, p.4090-4096, 1994.

KIMBERLING, CV; ARNOLD, KS; SCHWEITZER, DJ; JONES, RL; VONBYERN, H; LUCAS, M. Correlation of the presence of seminal white blood cells and the prevalence of separated spermatozoal heads with subclinical *Brucella ovis* infection in rams. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.189, n.1, p.73-76, 1986.

LAWRENCE, WE. Ovine brucellosis. A review of the disease in sheep manifested by epididymitis and abortion. *British Veterinary Journal*, v.117, p.435-446, 1961.

LAWS, L; SIMMONS, GC; LUDFORD, CG. Experimental *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*, v.48, p.313-317, 1972.

LIBAL, MC; KIRKBRIDE, CA. *Brucella ovis*-induced abortion in ewes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.183, n.5, p.553-554, 1983.

MAGALHÃES NETO, A; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.16, p.75-79, 1996.

MANTEROLA, L; TEJERO-GARCES, A; FICAPAL, A; SHOPAYEVA, G; BLASCO, JM; MARÍN, CM; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Veterinary Microbiology*, v.92, p.65-72, 2003.

MARCO, J; GONZÁLEZ, L; CUERVO, LA; HEREDIA, FB; BARBERÁN, M; MARÍN, C; BLASCO, JM. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Veterinary Record*, v.135, p.254-256, 1994.

MARÍN CM, BARBERAN M, JIMENEZ DE BAGÜES MP, BLASCO JM. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Research in Veterinary Science*, v.48, n.2, p.209-215, 1990.

MARÍN, CM; JIMENEZ DE BAGÜÉS, MP; BARBERÁN, M; BLASCO, JM. Efficacy of long-acting oxytetracycline alone or in combination with streptomycin for treatment of *Brucella ovis* infection of rams. *American Journal of Veterinary Research*, v.50, n.4, p.560-563, 1989b.

MARÍN, CM; JIMENEZ DE BAGÜÉS, MP; BLASCO, JM; GAMAZO, C; MORIYON, I; DIAZ, R. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Veterinary Record*, v.125, n.20, p.504-508, 1989a.

MARINHO, M; MATHIAS, LA. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.16, p.45-48, 1996.

MCGOWAN, B.; SCHULTZ, G. Epididymitis in rams. I. Clinical description and field aspects. *Cornell Veterinarian*, v.46, p.227-281, 1956.

MEINERSHAGEN, WA; FRANK, FW; WALDHAM, DG. *Brucella ovis* as a cause of abortion in ewes. *American Journal of Veterinary Research*, v.35, n.5, p.723-724, 1974.

MOLELLO, JA; JENSEN, R; FLINT, JC; COLLIER, JR. Placental pathology. I. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *American Journal of Veterinary Research*, v.24, p.897-904, 1963.

MUHAMMED, SI; LAUERMAN, LH; MESFIN, GM; OTIM, CP. Duration of *Brucella ovis* in ewes. *Cornell Veterinarian*, v.65, p.221-227, 1975.

MURILLO, M; GOÑI, MM; IRACHE, JM; ARANGOA, MA; BLASCO, JM; GAMAZO, C. Modulation of the cellular immune response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. *Journal of Controlled Release*, v.85, p.237-246, 2002.

MYERS, DM. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Applied Microbiology*, v.23, p.855-857, 1973.

MYERS, D.M.; JONES, L.M.; VARELA-DIAZ, V.M. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Applied Microbiology*, v.23, p. 894-902, 1972.

MYERS, DM; SINIUK, A. Preliminary report on the development of a diffusion-in-gel method for the diagnosis of ram epididymitis. *Applied Microbiology*, v.19, p.335-337, 1970.

OSBURN, BI; KENNEDY, PC. Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to *Brucella ovis*. *Path. Vet.*, v.3, p.110-136, 1966.

OSBURN, BI. The relation of fetal age to the character of lesions in fetal lambs infected with *Brucella ovis*. *Path. Vet.*, v.5, p.395-406, 1968.

PAOLICCHI, FA; P.A. CASARO, PA; GIMENO, EJ; KORTEBANI, LG; MAZZOLLI, AB. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research*, v.36, p.7-15, 2000.

PAOLICCHI, F. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesiones genitales y respuesta inmune antiespermática. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*, v.82, n.2, p.86-88, 2001.

PLANT, JW; EAMENS, GJ; SEAMAN, JT. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, v.63, n.12, p.409-412, 1986.

POESTER, FP; VAZ, AK. Comparação entre os métodos de gel difusão e fixação do complemento no diagnóstico da epididimite ovina causada por *Brucella ovis*. *Boletim I.P.V.D.F.*, v.4, p.53-56, 1977.

RAHALEY, RS; DENNIS, SM. Histopathology of experimental brucellosis in rams following vaccination with *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, v.61, n.11, p.353-356, 1984.

REDWOOD, DW; CORBEL, MJ. Interaction of *Brucella ovis* with ovine tissue extracts. *Veterinary Record*, v.113, p.220, 1983.

RIDLER, AL; WEST, DM. Effects of *Brucella ovis* infection on semen characteristics of 16-month-old red deer stags. *New Zealand Veterinary Journal*, v.50, n.1, p.19-22, 2002.

RIDLER, AL; WEST, DM; STAFFORD, KJ; WILSON, PR; FENWICK, SG. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. *New Zealand Veterinary Journal*, v.48, p.57-59, 2000.

ROBLES, CA; UZAL, FA; OLAECHEA, FV; LOW, C. Epidemiological observations in a Corriedale flock affected by *Brucella ovis*. *Veterinary Research Communications*, v22, p.435-443, 1998.

SEARSON, JE. The distribution of histopathological lesions in rams reacting in a complement fixation test for *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, v.64, n.4, p.108-109, 1987.

6 AGO 2005
VETERINÁRIA DA UFMG

SERGEANT, ESG. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. *New Zealand Veterinary Journal*, v.42, p.97-100, 1994.

SPENCER, TL; BURGESS, GW. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. *Research in Veterinary Science*, v.36, p.194-198, 1984.

TORRES, EDN; APARICIO, ED; QUEZADA, FV; TAVERA, FT; GÜEMES, FS. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovíños jóvenes. *Veterinaria México*, v.28, n.3, p.241-245, 1997.

VIGLIOLLO, AM; SILVA PAULO, PS; MESTRE, J; BRIONES, GC; DRAGHI, G; TOSSI, M; NIELSEN, K. Development and validation of the indirect enzyme immunoassay for the detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Veterinary Microbiology*, v.54, p.357-368, 1997.

WALKER, RL; LEAMASTER, BR; STELLFLUG, JN; BIBERSTEIN, EL. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.188, n.4, p.393-396, 1986.

WATT, DA. Testicular pathology of Merino rams. *Australian Veterinary Journal*, v.54, p.473-478, 1978.

BRUCELOSE SUÍNA

Alcina Vieira de Carvalho Neta¹
Ernane Fagundes do Nascimento²
Renato de Lima Santos³

1. INTRODUÇÃO

A Brucelose suína foi diagnosticada pela primeira vez em 1904, na Hungria por Hutyra como uma doença infecciosa associada a abortos em suínos (Hipólito et al., 1965). Em 1914, Traum isolou pela primeira vez nos Estados Unidos uma bactéria do gênero *Brucella* em fetos abortados de suínos, infecção essa que por muitos anos foi atribuída à *Brucella abortus*. Mais tarde Huddleston em 1929 isolou o mesmo agente e classificou a espécie como *Brucella suis*.

A *B. suis* é uma espécie caracterizada morfologicamente como cocobacilo, é uma cepa lisa estável de, aproximadamente, 0,4-0,8 por 0,6-3,0 µm. O organismo é geralmente solitário, não tem motilidade e não forma endósporos (Alton, 1990). Atualmente são conhecidos cinco biovaras

¹ Méd.Vet., MMV, Doutoranda. DCCV,
Esc. de Vet. da UFMG

² Méd. Vet., MMV, Doutor, Prof. Adj. DCCV,
Esc. de Vet. da UFMG.

³ Méd.Vet., PhD, Prof. Adj. DCCV,
Esc. de Vet. da UFMG. rlsantos@vet.ufmg.br

ou biótipos para *B. suis*, os biovaras 1, 2, 3, 4 e 5, sendo os biovaras 1, 2 e 3 os mais importantes para os suínos (Ewalt et al., 1997). O biovar 4 é enzoótico em renas e alces (*Rangifer sp.*) na Sibéria, Alaska e Canadá, não sendo patogênico para suínos, apesar de já ter sido descrito em casos de brucelose humana. O biovar 5 é o agente da brucelose em murinos (Mc Millan, 1999).

A brucelose suína está associada à infertilidade e aumento da taxa de mortalidade de leitões desmamados por ninhada, podendo alcançar índices de até 80%, o que faz com que a doença possa ter grande importância econômica. Essa mortalidade é insignificante em animais adultos, no entanto, porcas e varrões perdem seu valor podendo ser descartados devido à esterilidade. Além disso, deve-se destacar ainda, as perdas financeiras relacionadas às medidas de erradicação da doença em um rebanho (Radostits et al., 2002).

2. EPIDEMIOLOGIA

A infecção por *B. suis* tem distribuição mundial, destacando-se os biovaras 1 e 3 que ocorrem na Europa, América do Norte e do Sul, África, Ásia, Austrália e Ilhas do Pacífico (Frye et al., 1991). O biovar 2 restringe-se a Europa e o biovar 4 ao Canadá (Forbes et al., 1991). No Brasil, somente o biovar 1 já foi isolado (Caldas et al., 1963; Poester, 1977) e poucos são os achados de brucelose suína no país, decrescendo sua prevalência de 2,19% em um levantamento feito em 1981 (Garcia-Carrillo et al., 1987) para 0,34% nos últimos levantamentos (Brasil, 2000). Exames sorológicos de rotina realizados no Estado de Minas Gerais indicam que a

prevalência da brucelose suína é baixa no Estado, conforme detalhado na Tab. 1. Esse decréscimo se deve a intensificação e integração da produção suína em escala industrial (Poester et al., 2002).

Tabela 1. Resultados acumulados de exames sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Brucella suis* pelo card test (Alton et al., 1975), no Estado de Minas Gerais, nos últimos cinco anos*.

Período	% Resultados positivos	Número de animais
2000	0,00	137
2001	1,22	328
2002	0,00	14
2003	0,00	64
2004	0,00	33
Total	0,70	576

* Fonte: Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas - IPEVE, Belo Horizonte, MG.

As principais fontes de infecção da brucelose suína ocorrem através dos tratos gastrointestinal e reprodutivo. Suínos infectados, principalmente varrões ou sêmen de varrões não testados introduzidos em rebanhos livres podem disseminar a infecção (Hutching e Andrews, 1946). Os hábitos dos suínos e as características da doença sugerem o trato gastrointestinal como a principal porta de entrada do microorganismo, através da ingestão de fetos abortados, membranas fetais infectadas ou de secreções contaminadas (McMillan, 1999).

A probabilidade de ocorrência de brucelose em rebanhos suínos comerciais criados extensivamente em regiões onde existem

suínos selvagens contaminados é muito grande. Desta forma, porcos selvagens são importantes para a manutenção da brucelose suína (Leek et al., 1993; Nettles, 1991). Além disso, outros animais silvestres como lebres e ratos podem se constituir em fonte de infecção para suínos. Experimentalmente, suínos puderam ser infectados por *B. suis* através de mucosa conjuntival ou nasal, sendo demonstrado também a possibilidade de infecção através da pele escarificada ou intacta (Leek et al., 1993).

No que diz respeito a outras espécies domésticas, a infecção por *B. suis* (biovar 1 e 3), particularmente através do trato gastroenterico, ocorre em bovinos e eqüinos, especialmente quando estas espécies compartilham o mesmo pasto com suínos selvagens infectados. Essas espécies geralmente apresentam-se como hospedeiros não contagiosos, não constituindo em fonte de infecção para outros rebanhos e não apresentando transtornos reprodutivos (Ewalt et al., 1997), no entanto, podem comprometer um programa de erradicação da brucelose, pois os anticorpos produzidos na infecção por *B. suis*, reconhecidos nos testes sorológicos, reagem de forma equivalente para *B. abortus* causando confusão na interpretação dos resultados (Rogers et al., 1989).

O homem ou animais em contato com carcaças de suínos infectados, ou ainda, alimentados com carne suína crua ou mal cozida podem se infectar com *B. suis*, embora na maioria destes casos a infecção seja assintomática (Alton, 1990).

A capacidade de sobrevivência da *B. suis* no ambiente é um fator relativamente

importante na transmissão da doença. Evidências experimentais demonstram que *B. suis* não é resistente à pasteurização, duas a quatro horas de exposição ao sol e desinfetantes comuns. Por outro lado, a bactéria pode sobreviver em matéria orgânica sob refrigeração e em baixas temperaturas por até dois anos, o que evidencia a importância da implantação de programas sanitários efetivos no rebanho (Lushsinger et al., 1965).

Os suínos de todas as idades podem adquirir a infecção, no entanto, a literatura descreve maior prevalência da infecção em suínos adultos, principalmente em suinocultura intensiva onde a disseminação da doença é muito rápida. Portanto, a maior prevalência em adultos aparentemente está relacionada ao maior risco de exposição e não necessariamente à idade (Alton, 1990). Os leitões pós-desmame de ambos os sexos são suscetíveis à infecção pela ingestão de leite de porca portadora ou infecção congênita. Rebanhos infectados desenvolvem uma imunidade temporária, tornando-se, em um curto período de tempo, novamente suscetíveis. À semelhança do que ocorre em outras espécies domésticas, os suínos também apresentam resistência ou susceptibilidade determinadas geneticamente, verificadas a partir de cruzamentos entre animais selecionados fenotípicamente (Cameron, et al., 1942).

Os biovar 1 e 3 da *B. suis* são de alta patogenicidade para o homem, constituindo em um risco ocupacional para trabalhadores de abatedouros, açougueiros e veterinários. Freitas et al. (2001) ao relatarem sobre o risco de brucelose zoonótica associada a suínos de abate clandestino, observaram que de 139

amostras de soros de animais de diversas procedências do estado do Pará, submetidos ao diagnóstico sorológico card test e soro aglutinação rápida, 54 (42,2%) apresentaram anticorpos para *Brucella* sp. e títulos aglutinantes assim distribuídos: 16 (11,5%) com título de 1:50; 27 (17,0%) com títulos de 1:100; 8 (5,7%) com títulos 1:200 e 11 (7,7%) com títulos 1:400, demonstrando o elevado risco sanitário para pessoas no abate e para os consumidores. Por isso, brucelose causada por *B. suis* pode ter importância em saúde pública, devido ao risco de consumo de carne suína contaminada.

A infecção bovina por *B. suis* também tem importância zoonótica devido à localização do agente na glândula mamária e sua disseminação através do leite não pasteurizado (Ewalt et al., 1997; Alton, 1991; Alton et al., 1975; Becker et al., 1978).

3. MANIFESTAÇÃO CLÍNICA

As manifestações clínicas observadas na brucelose suína são bastante variáveis e dependem essencialmente do sítio de atuação da bactéria. Nas fêmeas suínas, os principais achados são infertilidade, estro irregular, nascimento de leitegadas pequenas ou de leitões fracos e abortos, que podem ocorrer em qualquer fase da gestação. A infertilidade ou abortos precoces geralmente se manifestam por sinais de estro entre 30 e 45 dias após a cópula ou inseminação que resultou em concepção (Deyoe & Manthei, 1969).

A persistência da *B. suis* no trato genital feminino varia consideravelmente. Após o aborto, algumas fêmeas apresentam descargas vaginais contaminadas com *B.*

suis por até 30 meses, contudo, na maioria das vezes, se não houver uma infecção vaginal secundária, estas voltam a ciclar com subsequente cópula e concepção bem sucedidas restaurando sua capacidade reprodutiva (Deyoe, 1986).

Nos varrões, as principais manifestações clínicas são orquite, epididimite (Fig. 1), além de dificuldade de locomoção nos casos em que ocorre artrite e osteomielite. Alguns machos desenvolvem infecção somente nas glândulas sexuais acessórias, não resultando em redução da fertilidade dos mesmos. Contudo, a infecção e lesões das glândulas sexuais são mais extensas e irreversíveis e, por isso, constituem em importante fonte de infecção pelo sêmen (Vandeplassche et al., 1967).

Em suínos jovens ou em crescimento, independente do sexo, a manifestação clínica mais comum é a espondilite e paralisia (Feldman & Olson, 1933).



Figura 1. Varrão. Bolsa escrotal aumentada de volume, assimétrica, devido a orquite por *Brucella suis*. (Cortesia do Prof. José Monteiro da Silva Filho).

Na brucelose suína não se prescreve tratamento com antibioticoterapia ou outros quimioterápicos. O uso de tetraciclinas, estreptomicina ou sulfonamidas, experimentalmente, isoladas

ou em associação em doses elevadas e por longo período mostrou-se temporariamente eficiente no controle da bacteremia. Contudo, após a supressão da prescrição destes medicamentos, a bactéria foi encontrada em tecidos suínos. Isto demonstra que a antibioticoterapia não é efetiva para eliminação da *B. suis* e da condição de portador, mesmo para animais que tem infecção inaparente (Radostits et al., 2002).

4. PATOGÊNESE E LESÕES

A patogênese da *B. suis* nos diferentes biovarias 1, 2 e 3 é bastante similar. Os organismos penetram na mucosa, geralmente do trato gastrointestinal ou reprodutivo, através de mecanismos ainda não conhecidos, desencadeando uma resposta inflamatória linfoplasmocitária no local. Em seguida colonizam os linfonodos regionais como organismos livres ou no interior de fagócitos. Com o desenvolvimento da linfadenite regional no sítio de entrada, os microorganismos alcançam a circulação linfática e sanguínea, promovendo bacteremia e consequente disseminação da infecção para os diferentes órgãos e tecidos, especialmente órgãos性 masculinos, útero, tecido ósseo e articular (Mc Millan, 1999).

O tempo de bacteremia varia de uma semana a 34 meses, resultando em sítios de infecções secundárias durante o curso da doença. Algum tempo após a exposição, os sítios de localização do organismo tendem a reduzir em número, ocorrendo persistência da *B. suis* principalmente nos órgãos do sistema reprodutivo que contém elevados níveis de eritritol e no interior do retículo endoplasmático rugoso do

trofoblasto coriônico, podendo ocorrer também lesões em outros órgãos, tais como: linfonodos, baço, fígado, rim, glândula mamária, tecido ósseo, articular e nervoso (Deyoe & Manthei, 1967).

O crescimento e multiplicação da *B. suis* no interior de macrófagos dos órgãos acometidos direciona o curso da infecção à uma possível resposta de hipersensibilidade retardada desenvolvida pelo organismo, determinante da lesão granulomatosa típica observada. Essa lesão se inicia com o acúmulo de histiocitos, células epitelioides, neutrófilos e células gigantes, seguida de necrose caseosa central e tecido fibroso capsular (Kennedy & Miller, 1993).

Embora possa ocorrer em qualquer fase da gestação, o aborto geralmente ocorre entre o segundo e terceiro mês de gestação, mas, comparativamente, sua incidência é relativamente menor do que na brucelose bovina. Na espécie suína, a morte de neonatos e morte embrionária precoce são mais freqüentes do que a ocorrência de aborto. Pode ocorrer retenção de placenta e endometrite, com o útero apresentando-se congesto, hemorrágico e edemaciado, havendo liberação de exsudato catarral de origem uterina, que contem grande quantidade de *B. suis* (Kennedy & Miller, 1993).

No útero e na tuba uterina, as lesões observadas são características e não dependentes do estado de gestação. As lesões se apresentam como pequenos nódulos amarelo-esbranquiçados de diâmetro entre 2 e 3mm na mucosa destes órgãos, que em podem coalecer, formando placas irregulares de exsudato caseoso no endométrio. Também podem ser observado

nestes órgãos, proliferação de tecido conjuntivo fibroso associado a um infiltrado inflamatório linfohistiocitário difuso (Enright, 1990; Kennedy & Miller, 1993).

Nos machos, têm sido verificados processos inflamatórios intensos nos testículos e epidídimo caracterizados por abscessão que determina necrose fibrinopurulenta do órgão. Esta lesão geralmente encontra-se circundada por células epitelioides formando um tecido conectivo capsular (Thomsen, 1932).

As lesões articulares, como sinovites, também são bastante comuns na brucelose suína e caracterizam-se por reações purulentas ou fibrinopurulentas que afetam principalmente as grandes articulações (Kened & Miller, 1993). As lesões ósseas tais como espondilites caracterizam-se por reações inflamatórias ou lesões granulomatosas localizadas principalmente nos discos intervertebrais das regiões lombar e sacral (Feldman & Olson, 1933).

5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O método mais sensível e específico de diagnóstico da brucelose suína é o isolamento do microorganismo, através de técnicas de cultura realizadas a partir de produtos de abortos, swabs vaginais, lesões testiculares, abscessos, linfonodos e sangue (Alton, 1990; Rogers et al., 1989).

A detecção de anticorpos anti-*B. suis* por de técnicas sorológicas também tem elevada sensibilidade, com numerosas alternativas metodológicas disponíveis. Os métodos de diagnóstico sorológico da brucelose suína foram adaptados e desenvolvidos com base no antígeno de

Brucella abortus, pois ambas possuem抗ígenos lipossacarídeos de superfície lisas muito similares (Payeur et al., 1990).

Os testes sorológicos mais comuns são os testes de aglutinação em placa e do cartão de rosa-de-bengala, o teste Rivanol, a fixação de complemento, imunodifusão em ágar-gel, aglutinação em tubo e 2-mercaptopoeteno (Leek et al., 1993). O teste de soroaglutinação em placa demonstra sensibilidade variando entre 62 a 79%, ao passo que a sensibilidade apresentada no teste de fixação de complemento e aglutinação em tubos varia de 40 a 51% (Alton, 1990; Payeur et al., 1990). O teste de imunodifusão, também usado no diagnóstico, demonstra resultados ainda menos sensíveis do que os testes sorológicos padrões (Payeur et al., 1990; Lord et al., 1992; Ferris et al., 1995). Os autores acrescentam ainda que a sensibilidade e a especificidade dos testes variam com a fase de infecção devendo ser realizados mais de um teste para o diagnóstico definitivo.

As pesquisas para o desenvolvimento de testes Imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme Immunossorbent Assay) para o diagnóstico da brucelose suína tem sido conduzidas, com resultados bastante satisfatórios, que indicam a futura utilização desse método em campanhas de controle e erradicação da doença (Office International des Epizooties, 1997).

Atualmente, a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e especialmente a nested-PCR tem sido um instrumento de grande sensibilidade na detecção diagnóstica da infecção por *B. suis*. Essa técnica molecular tem revolucionado as abordagens diagnósticas

e demonstrado capacidade na determinação e discriminação entre a infecção por *B. suis* e *B. abortus*, além da aplicabilidade como ferramenta diagnóstica utilizada a partir de diferentes amostras clínicas (Fayazi et al., 2002).

6. CONTROLE E ERRADICAÇÃO

Até o momento, não existe uma vacina disponível eficaz para *B. suis*. Vacinas contra *B. abortus* não apresentam bons resultados no controle da brucelose suína (Alton, 1990).

Um importante instrumento de controle de *B. suis* é o estabelecimento e manutenção de rebanhos fechados, livres da brucelose. A implementação de programas que estabelecem a identificação periódica, através de testes diagnósticos, de casos positivos da doença tem eliminado um grande número de rebanhos infectados (Spencer & Mattison 1975).

Quando diagnosticados animais positivos para *B. suis* algumas medidas podem ser tomadas no rebanho. A medida mais eficiente de controle é a despopulação completa, principalmente em rebanhos comerciais produtores de carne. A repopulação da propriedade com suínos livres da infecção, testados sorologicamente, deve ser realizada após o período de seis meses. A despopulação completa é uma alternativa de controle que resulta em impacto econômico elevado. Por isso, a erradicação pode ser feita a partir de um programa de despovoamento parcial.

A despovoação parcial é uma medida utilizada principalmente em suínos de reprodução, onde, a partir dos resultados

obtidos pelos testes de diagnóstico são eliminados todos os animais adultos reagentes ou não para *B. suis*, permanecendo somente os leitões, que proporcionarão a re-população do rebanho. Esse processo de erradicação é gradual e muitas vezes não alcança sucesso (Mc Millan, 1999). Segundo Radostits et al. (2002), a erradicação da brucelose suína somente poderá ser atingida desenvolvendo-se um núcleo a partir de rebanhos atestados e livres para esta doença, utilizados na reposição de rebanhos.

7. LEGISLAÇÃO PERTINENTE

Segundo instrução normativa nº14 e 15 de fevereiro de 2002, a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece normas para certificação de granjas de reprodutores suídeos. Esta norma determina que sejam realizadas provas sorológicas para brucelose com intervalos de seis meses, utilizando antígeno acidificado tamponado ou outro aprovado pelo MAPA e indicado para o caso. Deverão os soros reagentes ser submetidos às provas complementares como a do 2-mercaptopoetanol ou fixação de complemento. A granja de reprodutores terá as condições sorológicas ideais se todos os testes realizados forem negativos.

No caso de positividade, a granja terá sua certificação suspensa, os animais positivos deverão ser eliminados e realizados novos testes no plantel em até 30 dias. Persistindo a positividade, a granja perde a certificação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTON, GG. *Brucella suis*. In: An introduction to brucellosis, ed. Neilsen K, Duncan JR, I. Raton, Fla: CRC Press, p. 411-422, 1990.
- ALTON, GG; JONES, LM; PITTS, D. *Bacteriological methods*. In: Laboratory techniques in brucellosis. 2 ed. World Health Organization, Geneva, p. 11-63, 1975.
- ALTON, GG. *Porcine brucellosis as a world problem*. In: Networking in brucellosis research. ed. Frank JF: United Nations University Press, Tokyo, p. 217-231, 1991.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Boletim de Defesa Sanitária Animal, v.30, p. 50, 2000.
- BECKER, HN; BELDEN, RC; BREAUT, J; BURRIDGE, MJ; FRANKENBERGER, W; NICOLETTI, P. Brucellosis in feral swine in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.173, p.1182, 1978.
- CALDAS, AD; OLIVEIRA JR, BS; CASTRO, AFP. Tipificação de amostras de *Brucella suis* isoladas no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biológico*, v.30, p. 153-157, 1963.
- CAMERON, HS; HUGHES, EH; GREGORY, PW. Genetic resistance to brucellosis in swine. *Anim. Sci.*, v.1, p.106-110, 1942.
- DEYOE, BL. *Brucellosis*. In: Diseases of swine. 8 ed. The Iowa State University Press: Ames, p.5607, 1986.
- DEYOE, BL; MANTHEI, CA. Swine brucellosis. Proc. 1967 Symp. On Factors Producing Embryonic and Fetal Abnormalities, Death and Abort in Swine. ARS, p. 54-60, 1969.
- DEYOE, BL; MANTHEI, CA. Sites of localization of *Brucella suis* in swine. Proc. Annu. Meet. Livest. Sant. Assoc., v. 71, p. 102-108, 1967.
- ENRIGHT, FM. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In Animal Brucellosis. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.

EWALT, DR; PAYEUR, JB; RHYAN, JC; GEER, PL. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.9, p.417-420, 1997.

FAYAZI, Z; GHADERSOHI, A; HIRST, RG. Development of a *Brucella suis* specific hybridization probe and PCR which distinguishes *B. suis* from *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v. 84, p. 253-261, 2002.

FELDMAN, WH & OLSON, C. Spondylitis of swine associated with bacteria of the *Brucella* group. *Arch. Path.*, v.16, n.115, 1933.

FERRIS, RA; SCHOENBAUM, MA; CRAWFORD, RP. Comparison of serologic tests and bacteriologic culture for detection of brucellosis in swine from naturally infected herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.207, n.10, p.1332-1333, 1995.

FREITAS, JAF; GALINDO, GAR; SANTOS, EJC; SARRAF, KA; OLIVEIRA, JP. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. *Rev. Saúde Pública*, v.35, n.1, p.101-102, 2001.

FRYE, GH; GILSDORF, MJ; LENARD, D. Cooperative State Federal Brucellosis Eradication Program. *Proc. Annu. Meet US Anim. Health Assoc.*, v. 97, p. 138-154, 1991.

FORBES, LB. Isolates of *Brucella suis* biovar 4 from animals and humans in Canada, 1982-1990. *Can. Vet. J.*, v. 32, p 686-688, 1991.

GARCIA-CARRILLO, C. La Brucelose de los animales en America y su relacion con la infección humana. *Office International des Epizooties*, Paris, p. 43-70, 1987.

HIPÓLITO, O; FREITAS, MG; FIGUEIREDO, JB. *Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos*. 4 ed. Melhoramentos, 1965.

HUDDLESTON, IF. The Differentiation of the species of the genus *Brucella*. *Bull. Mich. Agric. Exp Stn.*, n. 100, 1929.

HUTCHING, LM; ANDREWS, FN. Studies on brucellosis in swine. *Am. J. Vet. Res.*, v. 7, 1946

KENNEDY, PC & MILLER, RB. The female genital system: Diseases of the pregnant uterus. In: *Pathology of Domestic Animals*. 4 ed, Academic Press, v. 3, p. 349-470, 1993.

LEEK, ML; VAN DER BECKER, HN; HUMPHREY, P; ADAMS, CL; BELDEN, R.C.; FRANKENBERGER, WB; NICOLETTI, PL. Prevalence of *Brucella* sp antibodies in feral swine in Florida. *J. Wildl. Dis.*, v.29, p.410-415, 1993.

LORD, VR; CHERWONOGRODZKY, JW. Evaluation of polysaccharide lipopolysaccharide and β-glucan antigen in gel immunodiffusion test for brucellosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, p. 389-391, 1992.

LUSHSINGER, DW; ANDERSON, RK; WERRING, DF. A swine brucellosis epizootic. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, n.147, p.632-636, 1965.

MC MILLAN, AP. *Brucellosis*. In: *Diseases of swine*, 8 ed. The Iowa state University Press: Ames, p. 385-393, 1999.

NETTLES, VF. Short and Long-term strategies for resolving problems of pseudorabies and swine brucellosis in feral swine. *Proc. Annu. Meet US Anim. Health Assoc.*, v.95, p.551-556, 1991.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnosis Tests and Vaccines*. 3 ed. Paris, 1997.

PAYEUR, JB; HENNAGER, SG; EWALT, DR. Comparison of five serologic tests and culture for brucellosis in swine experimentally infected with *Brucella suis* biovar 1. *Proc. Annu. Meet US Anim. Health Assoc.*, v. 94, p. 147-152, 1990.

POESTER, FP; GONÇALVES, VSP; LAGE, AP. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.55-62, 2002.

POESTER, FP. Isolamento de *Brucella abortus* e *suis* respectivamente em bovinos e suínos no RS e SC. In: V Congresso Estadual de Medicina Veterinária. 1977.

RADOSTITS, OM; GAY, CC; HINCHCLIFF, KW. *Clinica Veterinária*. 9 ed. Guanabara Koogan, p. 794-798, 2002.

ROGERS, RJ; COOK, DR; KETTLERER, PJ; BALDOCK, FC; BLACKALL, PJ; STEWART, RW. An Evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. *Aust. Vet. J.*, v.66, p.77-80, 1989.

SPENCER, PL; MATTISON, JR. Pike County, Illinois, swine brucellosis project. *Proc. Annu. Meet US Anim. Health Assoc.*, v.79, p.86-91, 1975.

THOMSEN, A. *Brucella* infection in swine. *Acta Path. Microb. Scand. Supp.* 1932.

TRAUM, J. Report to the Chief. *Bureau of Animal Industry*. USDA, p. 30, 1914.

VANDEPLASSCHE, M; HERMAN, J; SPINCEMAILLE, J; BOUTERS, R; DEKEYSER, P; BRONE, E. *Brucella suis* infection and infertility in swine. *Meded Veeartsenijsch Rijksuniv Gent*, v.11, p.1-40, 1967.



BRUCELOSE CANINA

Karina Leite Miranda¹
 Ana Claudia Pinto Cottorello¹
 Fernando Padilla Poester²
 Andrey Pereira Lage³

1. INTRODUÇÃO

Até a metade da década de 1960, os casos de brucelose relatados indicavam a infecção dos cães por *Brucella melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* (Morse, 1951; Taylor et al., 1975; Alton, 1990a; Alton, 1990b; Carmichael, 1990).

No meio da década de 1960, o estudo de uma epidemia de abortos em cães da raça beagle nos USA culminou, em 1966, com o isolamento de uma bactéria Gram negativo de fetos abortados que foi identificada como estando associada ao surto de abortos (Carmichael, 1966). Pela similaridade de algumas das características bioquímicas com bactérias do gênero *Brucella*, essas bactérias isoladas foram

classificadas como *B. canis* (Carmichael & Bruner, 1968; Moreno et al., 2002).

Desde então, a brucelose canina causada por *B. canis* já foi observada na África, Américas, Ásia e Europa (Carmichael, 1990; Wanke, 2004). A infecção vem sendo identificada como responsável por perdas significativas em canis (Carmichael, 1990, Johnson e Walker, 1992) e como causadora de doença no homem (Godoy et al., 1979; Corbel, 1997).

A brucelose canina por *B. canis* é uma doença contagiosa, com transmissão venérea e oral, caracterizada por problemas reprodutivos em machos e fêmeas, principalmente, aborto no terço final da gestação, podendo também levar a manifestações articulares e sistêmicas (Carmichael, 1990; Carmichael & Greene, 1990).

Apesar de ser menos patogênica para o homem que a infecção por outras espécies de *Brucella*, a infecção por *B. canis* já foi reconhecida como causa de zoonose (Swenson et al., 1972; Polt et al., 1982). Apesar de não ser comum a infecção humana, o caráter zoonótico da brucelose canina deve ser considerado devido à íntima relação da população canina com os homens e pelo estreito contato entre cães e crianças no ambiente familiar (Vargas et al., 1996; Almeida et al., 2001). No homem a doença se caracteriza por febre, calafrios, fadiga e linfadenopatia, mas em geral é assintomática (Acha e Szyfres, 1986). Em alguns casos raros, podem acontecer complicações como endocardite, meningite, artrite, hepatite e abscessos viscerais (Acha, Szyfres, 1986; Carmichael & Greene, 1990). A infecção humana acontece pelo contato com secreções

vaginais, material de aborto e parto de animais infectados e manipulação laboratorial (Acha, Szyfres, 1986; Carmichael, 1990; Shin, Carmichael, 1999).

2. EPIDEMIOLOGIA

2.1. Etiologia

A infecção de cães por *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* é ocasional e ocorre quando os animais se encontram em situações epidemiológicas de risco como criação em estreito contato com caprinos e ovinos (*B. melitensis*), suínos (*B. suis*) e bovinos (*B. abortus*) infectados (Morse, 1951; Santa Rosa et al., 1974; Taylor et al., 1975; Alton, 1990a; Alton, 1990b; Carmichael, 1990).

Os cães se infectam pela ingestão de leite cru ou pelo contato com tecidos animais e restos de abortos contaminados, em função de dividirem o mesmo ambiente com outra espécies infectadas. Geralmente se comportam como hospedeiros terminais dessas *Brucella* sp. (Carmichael, 1990). Apesar da infecção por essas outras *Brucella* sp., a brucelose de importância epidemiológica nos cães é a causada por *B. canis*.

A *B. canis* é um cocobacilo pequeno (1-1,5µm), Gram negativo, aeróbio, que se diferencia de outros membros do gênero *Brucella*, principalmente por apresentar morfologia colonial rugosa e por ter seu crescimento inibido pela presença de CO₂ (Alton et al., 1988). A *B. canis*, assim como a *B. ovis*, apresenta-se naturalmente com morfologia colonial permanentemente rugosa, não tendo sido nunca observada com morfologia lisa. Isto ocorre em função

destas bactérias não apresentarem o lipopolissacárido da parede celular completo (Diaz et al., 1968). Uma outra característica peculiar a *B. canis* é também apresentar colônias de aspecto mucóide (Carmichael, Kenney, 1970).

2.2. Hospedeiros

A infecção por *B. canis* tem sido naturalmente observada em canídeos domésticos e selvagens (Pollock, 1979; Carmichael, 1990). Sorologia positiva já foi observada em gatos (Randhawa et al., 1977; Larsson et al., 1984), mas estes apesar de poderem se infectar experimentalmente, são relativamente resistentes à infecção (Carmichael & Greene, 1990). Animais de laboratório como cobaias, podem ser infectados experimentalmente (Garcia-Carrillo, 1990).

2.3. Distribuição

A brucelose canina foi primeiramente diagnosticada nos USA na década de 1960 (Carmichael, 1966) como causa de abortos e falhas reprodutivas e, desde então, tem sido diagnosticada em vários países. A doença continua sendo de ocorrência comum em alguns estados do sudeste dos Estados Unidos (Wooley et al., 1977; Shin, Carmichael, 1999), estando bastante difundida em vários países como México (Flores-Castro, Segura, 1976), Argentina (Myers, Varela-Díaz, 1980; Baruta et al., 2001), Chile (Zamora et al., 1980), Peru (Carmichael, 1990), alguns países da Europa (von Krueger, 1974; Taylor, 1980), Japão (Yamauchi et al., 1974) e Índia (Srinivasan et al., 1992), tem sido também diagnosticada em canídeos comerciais.

Brucelose canina

Tabela 1. Freqüência de brucelose canina em diferentes regiões do Brasil.

Período	Estado	Cidade	Local	Técnica	Índice	Referência
1976	SP	São Paulo		SAT ⁽¹⁾	7,0	Sandoval et al., 1976
1977	MG	Belo Horizonte		Isolamento ⁽²⁾		Godoy et al., 1977
1977	RS	Porto Alegre		SAT	11,9	Wald, Fernandes, 1977
1981	SP	São Paulo		SAR ⁽³⁾	9,1	Larsson et al., 1981
				SAT	2,4	
				SAR-2ME ⁽⁴⁾	5,4	Germano et al., 1987
1981	SP	Campinas		IDGA ⁽⁵⁾	7,5	Cortes et al., 1988
1988	SP	São Paulo	Planalto	SAR	31,0	Schiemper, Vaz, 1990
1990	SC	Lages		SAT	9,0	
1997-1998	BA	Camaçari	M.te Gordo	IDGA		Melo et al., 1997/ 1998
1997-1998	PA	Belém		IDGA	45,4	Molnar et al., 2001
				FC ⁽⁶⁾	38,6	
				iELisa ⁽⁷⁾	46,1	
1998	SP	Serra de Botucatu ⁽⁸⁾		SAR	1,77	Moraes et al., 2002a
1999-2000	MG	Belo Horizonte		SAR-2ME	0,84	
1999	RJ	Rio de Janeiro		IDGA	4,8	Souza et al., 2002
		Niterói		IDGA	29,4	Maia et al., 1999
2000	RJ	Rio de Janeiro	12 Canis	IDGA	19,2	
2000-2002	SP	Diversas ⁽⁹⁾		IDGA	9,8	Vieira et al., 2000
2001	MG	Alfenas		IDGA	33,9	Keid et al., 2004
				Isolamento	14,0	
				IDGA	14,2	Almeida et al., 2004
				FC	38,6	
				iELisa	46,2	
2002	RJ	Rio de Janeiro	Zona Oeste	IDGA	9,2	Moraes et al., 2002b
2003	RJ	Rio de Janeiro		IDGA	58,3	Ferreira et al., 2003
				Isolamento	45,0	
2003	PB	Patos		IDGA	3,6	Alves et al., 2003
2003	SP	Santana de Parnaíba		IDGA, FC	2,2	Azevedo et al., 2003

⁽¹⁾-SAT-Soroaglutinação em tubo; ⁽²⁾-Primeiro Isolamento no país; ⁽³⁾-SAR-Soroaglutinação rápida; ⁽⁴⁾-SAR-2ME-Soroaglutinação rápida com 2-mercaptoetanol; ⁽⁵⁾-IDGA-Imunodifusão em gel de ágar; ⁽⁶⁾-FC- Fixação de complemento; ⁽⁷⁾-iELISA-ELISA indireto; ⁽⁸⁾-Microrregião da Serra de Botucatu; ⁽⁹⁾-Campo Limpo, Cotia, Itu, Jaú, Mogi das Cruzes, Osasco, São Bernardo do Campo e São Paulo

e centros de reprodução de pequenos animais, em vários outros países (Carmichael, 1990).

No Brasil, levantamentos sorológicos em cães têm revelado uma prevalência entre 0,84 e 58,3% dependendo da região e do tipo de criação (Tabela 1). Sandoval et al. (1976) foram os primeiros a constatar a presença de anticorpos contra *B. canis* em 7% dos cães de rua da cidade de São Paulo, sendo o primeiro isolamento realizado no ano seguinte em Minas Gerais

por Godoy et al. (1977). Neste experimento, a *B. canis* foi isolada a partir do sangue de uma cadela com histórico recente de aborto e título elevado na prova de soro-aglutinação.

As freqüências de sorologias positivas para *B. canis* nos diversos estudos realizados no Brasil não são diretamente comparáveis, pois há grandes diferenças no delineamento amostral, que variam de estudo de um canil com animais infectados a estudos de prevalência em animais de

companhia ou de animais errantes. No entanto, pode-se concluir que a infecção de cães por *B. canis* está disseminada no país.

2.4. Transmissão

A disseminação da brucelose em um canil é bastante rápida e os cães podem adquirir a doença pela penetração da *B. canis* nas mucosas conjuntival, vaginal e oronasal (Carmichael, Joubert, 1988). Geralmente a doença entra em um canil pela aquisição de cães infectados ou por cães que foram utilizados na reprodução com animais de fora do canil.

A infecção natural ocorre mais freqüentemente pela via oronasal após ingestão de alimentos contaminados, contato com placenta ou fetos abortados, onde a concentração de bactérias pode chegar a 10^{10} bactérias/ml (Carmichael, Joubert, 1988), ou com descargas vaginais de cadelas infectadas que estão no cio ou que abortaram. Estas descargas vaginais podem conter altas concentrações de *B. canis* (10^8 bactérias/ml) por até seis semanas pós-aborto (Carmichael, Kenney, 1970; Carmichael & Greene, 1990). A dose infectante por via vaginal ainda não está estabelecida, mas a dose infectante por via oral é de 10^6 bactérias/ml (Carmichael, Joubert, 1988) e por via conjuntival de 10^4 - 10^5 bactérias/ml (Serikawa, Muraguchi, 1979).

Outra forma importante de transmissão da brucelose canina é a transmissão sexual. O macho excreta *B. canis* pelo sêmen principalmente nos primeiros dois meses pós-infecção, mas esta excreção pode continuar de forma intermitente por mais de dois anos em cães aparentemente saudáveis (George et al., 1979). A transmissão sexual

pode ocorrer tanto do macho para a fêmea como da fêmea para o macho, pois as secreções do cio possuem altas concentrações do microorganismo.

Embora ambos os sexos eliminem bactérias na urina, a concentração de *B. canis* presente na urina dos machos é maior (10^3 a 10^6 bactérias/ml), sendo mais importante como fonte de infecção (Serikawa, Muraguchi, 1979).

A brucelose canina não foi transmitida entre animais impúberes, machos e fêmeas, mantidos juntos por vários meses em contato estreito; entretanto houve transmissão em ambos os sexos após o estro ou a cobertura (Carmichael, 1990). A transmissão da doença entre cães machos sexualmente maduros mantidos juntos também já foi observada (Carmichael, Joubert, 1988; Serikawa, Muraguchi, 1979).

A realização de transfusões sanguíneas com a utilização de animais doadores infectados também constitui uma forma importante de transmissão da doença, devendo somente ser realizadas com animais sorologicamente negativos, pois a bacteremia na infecção por *B. canis* pode persistir por mais de cinco anos (Carmichael, 1990).

B. canis já foi isolada de *Rhipicephalus sanguineus* que se alimentavam em animais infectados (Peres et al., 1981), mas a importância da transmissão da brucelose canina via carrapato não está esclarecida. A transmissão vertical e via ingestão de leite de cadelas infectadas também já foram relatadas (Carmichael & Greene, 1990). Torna-se importante a transmissão via fômites, equipamentos ou instalações

Brucelose canina

contaminadas em função da grande quantidade de microorganismos eliminados durante o parto ou aborto ou mesmo na urina dos cães machos e a alta resistência de *B. canis* no ambiente (Carmichael, 1990; Johnson, Walker, 1992; Megid et al., 1999).

3. PATOGENIA

A patogenia da infecção por *B. canis* se assemelha ao padrão de infecção por outros microorganismos do gênero *Brucella*; a infecção ocorre via membranas mucosas e o período de incubação é muito variável.

Uma característica importante da brucelose canina é a longa bacteremia que se inicia em torno de uma a duas semanas após a infecção do organismo hospedeiro. Esta bacteremia, que pode permanecer por mais de cinco anos de forma intermitente e em níveis elevados (superior a 10^3 bactérias/mL), é responsável pela disseminação da bactéria no organismo (Carmichael, 1990).

Por ser uma bactéria intracelular facultativa, em função de sua capacidade de sobreviver em células fagocitárias, principalmente macrófagos, a disseminação da *B. canis* no organismo está associada a leucócitos. Infecta principalmente órgãos linfóides, como linfonodos, baço e medula óssea, e o trato reprodutivo de animais de ambos os性es.

Ao atingir os órgãos linfóides, a *B. canis* causa uma hiperplasia linforeticular generalizada, envolvendo principalmente os linfonodos retrofaríngeos e inguinal, além de hiperglobulinemia. É característica da doença a persistência de anticorpos não

protetores, que parecem ter pouca influência no nível de bacteremia ou número de microorganismos nos tecidos (Carmichael & Greene, 1990).

A exemplo do que ocorre na infecção por outros parasitas intracelulares, a imunidade mediada por células é o mecanismo de defesa mais importante contra *B. canis* (Carmichael & Greene, 1990; Wyckoff, 2002).

Nos machos, a qualidade do sêmen está bastante alterada em animais infectados por *B. canis*. Ao exame do sêmen, 30 a 80% dos espermatozoides apresentam aspecto anormal duas a cinco semanas pós-infecção e após 20 semanas, mais de 90% dos espermatozoides apresentam anormalidades e redução de motilidade (Carmichael, 1976). Um achado muito sugestivo de brucelose canina é a presença de espermatozoides aglutinados. Isto provavelmente é consequência da quebra da barreira hematotesticular, em função da inflamação e lesões causadas pela *B. canis*, e liberação de antígeno espermático extratubular, o que induz o sistema imune a produzir anticorpos aglutinantes antiesperma (espermaglutininas) (Serikawa et al., 1981). Estes auto-anticorpos contra espermatozoides estão presentes no plasma seminal de animais infectados, mesmo na ausência de anticorpos anti-*B. canis* (Carmichael, 1976).

A resposta imune desencadeada contra os espermatozoides contribui para a epididimite, infertilidade e eventual interrupção espermogênica observada na maioria dos machos infectados (Carmichael & Greene, 1990). Além disso, *B. canis* infecta a próstata e os testículos causando prostataite e orquite, que pode evoluir nos casos crônicos para atrofia testicular (Carmichael, 1990).

O útero não gestante ou no diestro não é um ambiente propício à infecção por *B. canis* (Carmichael, 1990). Entretanto, em fêmeas gestantes, *B. canis* pode invadir células do epitélio placentário, transformando a placenta em um importante ambiente de multiplicação do agente, o que ocasiona a morte do embrião ou feto e o aborto (Carmichael & Greene, 1990). O feto se infecta no útero via placenta ou líquido amniótico (Carmichael, Kenney, 1970).

A *B. canis* também pode se instalar em outros tecidos, causando discoespondilite, uveíte, glomeronefrite, meningite e endocardite (Henderson et al., 1974; Saegusa et al., 1977; Kerwin et al., 1992; Ying et al., 1999).

Alguns animais podem apresentar recuperação espontânea em torno de um a cinco anos após a infecção. Cães recuperados apresentam resultado negativo ou baixos títulos de anticorpos aglutinantes e são imunes à reinfeção, o que reforça o papel da imunidade mediada por células na proteção contra a infecção por *B. canis* (Carmichael, 1976; Carmichael & Greene, 1990; Wyckoff, 2002).

4. SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

Os sinais clínicos da brucelose canina estão associados principalmente ao trato reprodutivo de machos e fêmeas. No entanto e apesar da difusão sistêmica da doença, os animais infectados com *B. canis* são geralmente assintomáticos, principalmente antes da puberdade, quando o sinal clínico mais evidente, quando ocorre, é uma linfoadenopatia generalizada. A febre também não é um achado frequente em animais infectados

(Carmichael & Greene, 1990; Wanke, 2004).

Animais infectados pela via oral apresentam os linfonodos retrofaríngeos aumentados de volume, enquanto as fêmeas infectadas pela via vaginal normalmente apresentam aumento de volume nos linfonodos inguinais superficiais e ilíacos externos. Este aumento de volume já é palpável duas semanas após a infecção. Com a progressão da doença outros linfonodos podem ser acometidos, tornando-se também evidente a esplenomegalia. Outra alteração comum é a presença de infiltrado inflamatório em todos os órgãos do trato geniturinário (Carmichael, 1990).

A brucelose canina é mais freqüentemente diagnosticada nos machos que nas fêmeas em função do aumento de volume e problemas apresentados no epidídimo e escroto. Em presença de aborto nas fêmeas, infertilidade ou epididimite nos machos, geralmente há poucos problemas de diagnóstico, especialmente quando estes quadros clínicos ocorrem num canil, onde vários animais estão contaminados. Maior dificuldade diagnóstica ocorre quando um único animal aparentemente normal se apresenta para diagnóstico.

No macho, a infecção geralmente é acompanhada de baixo desempenho reprodutivo e infertilidade. Isto se deve à epididimite e prostatite causadas pela *B. canis*. Diferentemente do que ocorre na brucelose bovina e suína, na brucelose canina a orquite não é um achado consistente (Fig.1), principalmente em raças pequenas, mas normalmente observa-se degeneração de epitélio seminífero (Carmichael, Kenney, 1970). Há

diminuição de volume do sêmen e aumento de anormalidades espermáticas como espermatozoides imaturos, caudas dobradas, gota citoplasmática e cabeças isoladas (Carmichael, 1976). A aglutinação espermática e presença de células inflamatórias também são observadas (Serikawa et al., 1981). Os animais acometidos, principalmente com epididimite, apresentam dor e sensibilidade, lambendo freqüentemente o escroto. É comum encontrar nestes cães dermatite escrotal, contaminada por estafilococos não hemolíticos, em função desta lambadura (Carmichael, Kenney, 1970). Em infecções crônicas pode haver prostatite granulomatosa, azoospermia e atrofia testicular (Carmichael, 1990).

A principal suspeita de brucelose canina é a ocorrência de aborto em torno do 45º-55º dia de gestação (Fig.2), pois a infecção por *B. canis* é a principal causa de aborto em cadelas no terço final de gestação. O aborto, apesar de ocorrer com mais freqüência no final de gestação, pode ocorrer em qualquer fase gestacional. É comum observar-se falha na concepção, em fêmeas não estéreis, após uma cobertura aparentemente bem sucedida, o que sugere morte embrionária (Carmichael Kenney, 1970). Também já foram observados abortos precoces em torno de 10 a 20 dias pós-cobertura (Carmichael, 1976). Não há interferência da infecção com o ciclo estral e estro dos animais. A maior parte das cadelas tem partos normais nas gestações subsequentes ao aborto, mas, há relatos de casos de cadelas que apresentam até quatro abortos consecutivos. Por vezes, o único indicativo da ocorrência de aborto é a descoberta, por volta de duas semanas antes da data prevista para o parto e da ausência de fetos

no útero. Isto se deve ao costume das cadelas de ingerir todo o material expelido no aborto, principalmente quando são criadas num espaço reduzido. Um sinal evidente deste quadro é uma descarga vaginal mucóide, serosanguinolenta ou cinza esverdeado, que é altamente infeciosa (Carmichael, Kenney, 1970).

Os fetos abortados estão geralmente autolisados, com edema subcutâneo, congestão e hemorragia da região

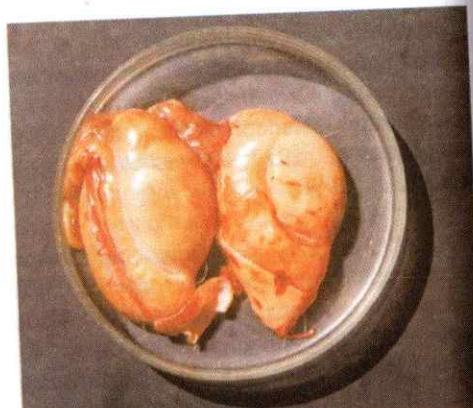


Figura 1. Testículos de cão com infecção por *B. canis*.



Figura 2. Feto de cadela maltês abortado em consequência da infecção por *B. canis* no 45º dia de gestação.

abdominal subcutânea, o que sugere que a morte fetal no útero é anterior em alguns dias ao aborto (Carmichael, 1990). As cadelas infectadas podem parir natimortos ou filhotes fracos em duas ou três gestações e apresentarem ninhadas normais em gestações subsequentes. Há relatos da ocorrência de cães vivos e mortos em uma mesma ninhada. Fetos vivos expelidos próximo ao final da gestação normalmente são fracos e morrem dentro de 24 a 48 horas; porém em alguns casos, filhotes infectados no útero sobrevivem e o único sinal clínico apresentado é o aumento de linfonodos (Carmichael, Kenney, 1970).

Em infecções crônicas, as fêmeas podem apresentar endometrite subaguda ou crônica. Outros sinais clínicos além dos reprodutivos e dos associados à infecção dos órgãos linfóides são observados com menor freqüência. A discoespondilite pode inicialmente se manifestar como dor lombar, mas posteriormente pode comprimir a medula acarretando paresia e ataxia. Meningite crônica e encefalite não supurativa podem ser observadas. São encontrados também poliartrite, osteomielite, glomerolonefrite e uveite (Carmichael, Kenney, 1970; Carmichael & Greene, 1990; Wanke, 2004).

5. DIAGNÓSTICO

Os sinais clínicos são, normalmente, insuficientes para se estabelecer o diagnóstico de brucelose canina, pois as manifestações clínicas podem ser bastante variáveis. Apesar disso, a ocorrência de aborto após 45 dias de gestação é altamente sugestiva de brucelose canina (Fig.1). Outros sinais clínicos sugestivos não falhas de concepção nas fêmeas e epididimite, atrofia testicular, dermatite

escrotal e baixa qualidade de sêmen nos machos. Não há alteração nas características hematológicas dos animais infectados (Carmichael, 1990), mas o exame de sêmen pode ser muito útil, já que as anormalidades espermáticas podem ser observadas cinco semanas após a infecção e se tornam pronunciadas por volta da oitava semana pós-infecção (George et al., 1979).

É importante o estabelecimento de um diagnóstico diferencial sempre que houver histórico de aborto em fêmeas ou baixo desempenho reprodutivo em ambos os sexos. Este diagnóstico só é possível com a utilização de testes laboratoriais para a detecção do agente ou de resposta do hospedeiro à infecção. Os testes mais empregados nos diagnósticos de brucelose canina são os testes sorológicos que na maioria das vezes carecem de sensibilidade para a detecção de todos os animais infectados. Desta forma a melhor estratégia diagnóstica é a utilização de testes sorológicos e bacteriológicos em paralelo para se aumentar a sensibilidade (Alton et al., 1988; Wanke, 2004).

5.1. Testes Sorológicos

Uma característica importante de *B. canis* que influencia diretamente o diagnóstico é esta bactéria se apresentar sempre com morfologia colonial rugosa, o que reflete a ausência da cadeia O do lipopolissacarídeo (LPS) (Alton et al., 1988; Poester et al., 2005). Desta forma, os抗ígenos preparados com amostras lisas de *Brucella* sp., como os preparados com *B. abortus* para o diagnóstico de brucelose bovina, não são capazes de detectar anticorpos anti-*B. canis*. Para tal é necessário a utilização de抗ígenos preparados com

amostras rugosas de *Brucella* sp., *B. canis* ou *B. ovis*.

Muitos métodos sorológicos têm sido empregados no diagnóstico da brucelose canina, mas, devido especialmente à presença de anticorpos inespecíficos, individualmente nenhum deles é considerado como teste definitivo (Carmichael, 1976). A maioria dos testes sorológicos utilizados na brucelose canina, não apresenta resultados consistentes durante as quatro semanas iniciais da infecção. Depois disso, os animais apresentam anticorpos detectáveis na maioria dos testes e que podem ser identificados por vários meses após a bacteremia haver cessado (Carmichael, Kenney, 1970). Apesar da grande variedade de testes diagnósticos empregados no diagnóstico da brucelose canina, os mais empregados são os testes de aglutinação, em geral na presença de 2-mercaptopetanol, de imunodifusão e os ensaios imunoenzimáticos.

A aglutinação rápida em lâmina é um teste sensível e detecta animais recentemente infectados. Emprega antígeno elaborado com a *B. canis* ou *B. ovis* corado com rosa de bengala. É um teste rápido e prático. Resultados positivos devem ser interpretados com cautela, pois uma proporção significativa de resultados falso positivos ocorre neste teste, sendo por isto usado como um teste de triagem (George, Carmichael, 1978). Neste teste o resultado negativo é uma forte evidência de que o animal não está infectado, mas apenas 50% dos animais cujo soro apresenta aglutinação são realmente positivos. Logo, animais positivos neste teste não podem ser considerados infectados antes de serem submetidos a um teste confirmatório. Uma

modificação deste teste com o tratamento prévio dos soros com 0,2M de 2-Mercaptopetanol (2ME) antes de se adicionar o antígeno corado, diminui os resultados falso positivos. Testes mais específicos foram padronizados com antígenos preparados com *B. canis* M (menos mucóide) (Zoha, Carmichael, 1981; Zoha, Carmichael, 1982a).

Aglutinação em tubo com ou sem a utilização de 2ME e imunodifusão em gel de ágar são testes amplamente difundidos, que utilizam antígenos totais ou de parede (extratos salinos), elaborados com *B. ovis* ou *B. canis*. São métodos adicionais de diagnóstico laboratorial, usados geralmente como provas confirmatórias à prova de triagem em lâmina. Apesar de sua maior especificidade, também podem apresentar resultados falso positivos, além da dificuldade de interpretação, especialmente em animais recentemente infectados ou na fase crônica da doença (Zoha, Carmichael, 1982b; Carmichael, 1990; Wanke, 2004).

Vários testes de Elisa (ensaios imunoenzimáticos) têm sido desenvolvidos, utilizando tanto antígenos de parede de *B. canis* (Serikawa et al., 1989) como antígenos citoplasmáticos de *B. abortus*, que são comuns a diversas espécies de *Brucella* (Baldi et al., 1994). Estes últimos têm como vantagem, não apresentarem reação cruzada com bactérias que não sejam do gênero *Brucella*. Testes de Elisa com antígenos purificados têm sido indicados como provas confirmatórias aos testes de triagem, em substituição às provas de 2ME ou imunodifusão em gel de ágar (Lucero et al., 2002; Ebani et al., 2003).

No Brasil há escassez de抗ígenos e kits para o diagnóstico de brucelose canina. Na maior parte das vezes são empregados抗ígenos produzidos com *B. canis* no próprio laboratório (Figueiredo et al., 2003; Marassi et al., 2004) ou抗ígenos comerciais produzidos com *B. ovis* para o diagnóstico de epididimite ovina. Ambos os抗ígenos são empregados em testes de imunodifusão em gel de ágar.

5.2. Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico definitivo de brucelose canina pode ser baseado no isolamento da *B. canis* de tecidos ou do sangue. Vários materiais se adequam muito bem ao isolamento como sangue, fetos abortados, restos placentários, secreções vaginais no estro ou no pós-aborto e pós-parto e sêmen. Outros materiais empregados menos freqüentemente e com menor sucesso são urina, principalmente de machos, aspirados de medula óssea, linfonodos, baço, fígado, epidídimo e próstata. Estes materiais podem ser coletados em meio de transporte ou mantidos congelados até seu processamento laboratorial (Alton et al., 1988). Para a hemocultura é necessário utilizar o sangue completo, já que os organismos são encontrados na fração leucocitária (Alton et al., 1988). O material deve ser coletado de animais que não estão recebendo tratamento antibacteriano (Wanke, 2004).

O organismo cresce bem em aerobiose (CO_2 é inibidor de crescimento), em meios convencionais utilizados para *Brucella* sp. Em materiais muito contaminados sugere-se o uso de meios enriquecidos com antibióticos como o de Thayer-Martin (Alton et al., 1988).

A hemocultura é freqüentemente empregada na bacteriologia em função do longo período de bacteremia e de possibilitar uma coleta estéril. A bacteremia pode ser detectada duas a quatro semanas após a infecção e, não havendo tratamento do animal, pode persistir por mais de cinco anos. A concentração de bactérias no sangue pode exceder 10^3 /ml (Carmichael, 1990). A hemocultura, no entanto, não deve ser o único critério para diagnosticar a infecção, já que a bacteremia na fase crônica é intermitente e em animais infectados por longos períodos a infecção está presente somente em 25% dos animais (Johnson, Walker, 1992).

Secreção vaginal, coletada no período imediatamente após o aborto ou parto, é o material mais propício para o isolamento. A bactéria pode ser isolada por até seis semanas depois do aborto (Carmichael & Greene, 1990).

Nos machos, a bactéria pode ser isolada do sêmen entre três e onze semanas após a infecção. Após doze semanas, a concentração de bactérias no sêmen declina e o diagnóstico passa a ser usualmente negativo (Johnson e Walker, 1992).

A cultura de urina pode ser positiva em alguns animais, principalmente machos, quando a hemocultura é negativa. No entanto, é necessário fazer a coleta da urina por cistocentese, para se evitar o crescimento exagerado de contaminantes (Carmichael, 1990; Wanke, 2004).

A utilização conjunta do diagnóstico bacteriológico, principalmente pela hemocultura e isolamento de secreções

vaginais ou fetos abortados, com os testes sorológicos disponíveis propicia uma melhor sensibilidade diagnóstica, facilitando o controle e prevenção da brucelose canina.

6. TRATAMENTO

O tratamento das infecções por bactérias do gênero *Brucella* nos animais domésticos geralmente não tem sucesso, o que também é observado no tratamento da brucelose canina (Jennings et al., 1974; Johnson, Walker, 1992; Wanke et al., 2000, Azevedo et al., 2004). Por ser um parasita intracelular e pela infecção nos animais domésticos geralmente só ser diagnosticada na fase crônica da doença, além de ser resistente a várias bases, nenhuma das drogas ou associações utilizadas mostrou 100% de eficiência na eliminação de *B. canis* (Nicoletti, Chase, 1987; Carmichael & Greene, 1990; Wanke, 2004).

O tratamento não é recomendado para cães em regime de cobertura e antes de se começar o tratamento, o macho ou a fêmea devem ser mantidos em repouso sexual. Muitas vezes os animais tratados têm redução ou desaparecimento dos títulos sorológicos logo após o tratamento, mas com o término do tratamento, os títulos voltam a aparecer em algumas semanas ou meses (Jennings et al., 1974; Wanke et al., 2000; Wanke, 2004). Mesmo que o microorganismo seja eliminado, machos freqüentemente tornam-se estéreis devido ao dano irreversível nos testículos e epidídimos (Shin, Carmichael, 1999).

Em função de ser caro e da cura ser dificilmente alcançada, permitindo que animais infectados continuem eliminando

o agente e infectando tanto outros animais susceptíveis quanto o homem, a decisão sobre o tratamento deve ser muito bem pensada e discutida com o proprietário, que deve estar consciente dos riscos do tratamento.

Associações de antibióticos que têm apresentado melhor resultado estão descritas na tabela 2.

As fêmeas são mais eficientemente curadas com estes tratamentos que os machos, pois nestes o microorganismo permanece na próstata e no epidídimos. Algumas fêmeas submetidas ao tratamento tornam-se cronicamente infectadas, apesar de não apresentarem sintomas. Filhotes nascidos de fêmeas cronicamente infectadas, quando sobrevivem, desenvolvem a doença ao alcançar a puberdade e disseminam o microorganismo. Portanto, deve ser recomendado que animais positivos não sejam mantidos para a reprodução, mesmo que sejam de alto valor genético (Carmichael, 1990).

7. PREVENÇÃO E CONTROLE

O controle da brucelose canina é uma tarefa árdua, de custo elevado e que pode levar bastante tempo. Portanto, medidas preventivas devem ser adotadas para se evitar a entrada da doença no canil.

Os critérios sanitários para a aquisição de animais devem ser bastante estritos:

- Adquirir preferencialmente cães de canis livre de brucelose canina;
- todos os animais a serem adquiridos devem possuir dois testes negativos intervalados de 30 dias;
- manter os animais adquiridos em quarentena por 8 a 12 semanas;

• só adquirir animais que não tenham sido expostos ao agente e que não apresentem sinais clínicos sugestivos de brucelose canina;

- só permitir o cruzamento dos cães do canil com animais negativos aos testes, preferencialmente de canis livre da doença;
- manter separados e testar todos os animais que foram cruzados por animais externos ao canil 30 dias após a cobertura;
- se houver participação em exposição e feiras ou cruzamentos com cães externos ao canil, deve ser realizado teste anual de todos os animais púberes do canil.

A confirmação da infecção por *B. canis*, por sorologia ou hemocultura, em cadelas que abortaram ou de machos com epididimite ou baixo desempenho reprodutivo indica que medidas de controle devem ser implementadas, pois estes cães constituem-se em fonte de infecção para outros animais e para as pessoas em contato (Carmichael, 1990; Carmichael & Greene, 1990; Azevedo et al., 2004; Wanke, 2004).

Como ainda não há vacinas eficientes contra a infecção por *B. canis*, o controle da brucelose canina em um canil é baseado em teste e sacrifício de animais. Estratégias que utilizam a segregação de cães infectados regularmente não apresentam bons resultados, pois é muito difícil manter uma separação absoluta entre os cães infectados e os cães negativos aos testes. O tratamento também deve ser evitado, pois geralmente não apresentam resultados satisfatórios. O diagnóstico deve ser realizado por sorologia e hemocultura para se aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

Todos os animais púberes do canil devem ser testados a intervalos de 30 dias. Os animais reagentes e inconclusivos aos testes de triagem devem ser submetidos a testes confirmatórios para se aumentar a especificidade do diagnóstico. Os animais confirmados como infectados devem ser sacrificados.

Todos os animais devem ser testados antes do cruzamento e somente os animais negativos devem entrar em reprodução. As fêmeas devem ser testadas algumas semanas antes do cio para se evitar contratempos decorrentes de novo teste dos animais. As fêmeas que abortarem devem ser mantidas separadas até a realização dos testes diagnósticos.

Durante o controle da brucelose canina em um canil, deve-se evitar o trânsito de animais. Os cães oriundos do canil podem estar infectados em período de incubação e constituírem-se em risco de transmissão da doença para outros animais ou canis. Os animais que forem introduzidos no canil podem se infectar pelo contato com fômites contaminados ou animais infectados ainda não detectados.

A separação das fêmeas gestantes ou no cio pode minimizar a transmissão da brucelose canina em um canil. Desta forma pode-se restringir o número de animais que estarão em contato com estas fêmeas no período de maior eliminação e maior risco de transmissão da *B. canis*. A limpeza e a desinfecção são de fundamental importância no controle da brucelose canina. Locais com acúmulo de resíduos, com baixa incidência de luz solar, com umidade elevada e temperaturas mais baixas propiciam a sobrevivência de *B. canis* no ambiente.

Brucelose canina

Tabela 1. Regimes terapêuticos de maior eficácia empregados no tratamento da brucelose canina.

Drogas	Via	Dose (mg/kg)	Freqüência	Período	Referência
Tetraciclina Estreptomicina	Oral	30	2 x ao dia	28 dias	Nicoletti (1991)
	IV	20	1 x ao dia	Dias 1 a 14	
Tetraciclina Estreptomicina	Oral	30	3 x ao dia	30 dias	Nicoletti e Chase (1987)
	IM	20	1 x ao dia	Dias 1 a 7 e 24 a 30	
Minocyclina	Oral	25	1 x ao dia	14 dias	Johnson e Walker (1992)
Diidroestreptomicina	IM	5	2 x ao dia	7 dias	
Oxytetraciclina de longa ação	IM	20	1 x por semana	4 semanas	Zoha e Walsh (1982)
Estreptomicina	IM	15	1 x ao dia	Dias 1 a 7	

Os fômites contaminados (vasilhas de alimentação e água, seringas, botas, etc.) podem levar a infecção de um local a outro. A higienização de instalações, de fômites e das mãos dos tratadores deve ser implementada em todos os canis com problema. Após a limpeza, a desinfecção pode ser realizada com produtos a base de amônio quaternário, ionóforos ou hipocloritos. Estes procedimentos devem ser adotados em instalações onde estavam alojados animais infectados, fêmeas ou machos (contaminação com urina), e nos locais onde as cadelas abortaram, pois reduz a carga infectante ambiental.

O canil só deverá ser considerado livre de brucelose canina após três testes negativos consecutivos de todos os cães, intervalados 30 a 60 dias. O canil deve ainda ser monitorado pela realização de testes em todos os animais intervalados de 3-4 meses pelo período de um ano.

Situação diferente se impõe quando do diagnóstico de brucelose canina em animais de companhia. Em função do

envolvimento sentimental, normalmente é muito traumático o sacrifício do animal. Nessas situações, os animais podem ser castrados, o que elimina as principais fontes de infecção: a transmissão sexual em ambos os sexos, as secreções de cio e aborto/parto, nas fêmeas, e a eliminação na urina, em função da regressão da próstata, nos machos. Pode-se associar o tratamento com antimicrobianos à castração. Os animais tratados devem ser submetidos a testes de monitoramento por pelo menos 90 dias após o término do tratamento. De toda forma, medidas de limpeza e desinfecção devem ser adotadas, para eliminar a contaminação ambiental e diminuir o risco de transmissão ao homem.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2 ed. Washington, Organization Panamericana de la Salud, 989 p. 1986.

ALMEIDA, A.C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R.M.Z.; OLIVEIRA, M.M.N.F. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p. 275-276, 2004.

ALTON, G.G. *Brucella melitensis*. In: Nielsen K.; Duncan J.R. ed. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 383-409, 1990a.

ALTON, G.G. *Brucella suis*. In: Nielsen K.; Duncan J.R. ed. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 411-422, 1990b.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris : INRA, 1988. 190p.

ALVES, C.J.; ALVES, F.A.L.; GOMES, A.A.B.; AZEVEDO, S.S.; ANDRADE, J.S.L.; SANTOS, F.A. Aspectos epidemiológicos de *Brucella canis* em Patos, Paraíba, Brasil. *Cienc. Anim.*, v. 13, p. 45-49, 2003.

AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, S.A.; ALVES, C.J.; KEIDL.B.; GRASSO, L.M.P.S.; MASCOLI, R.; PINHEIRO, S.R. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 23, p. 156-160, 2003.

AZEVEDO, S.S., VASCONCELLOS, S.A., ALVES, C.J. Brucelose canina por *Brucella canis*. *Rev. CFMV*, v. 10, p 38-46, 2004.

BALDI, P.C.; WANKE, M.M.; LOZA, M.E.; POSSATTI, C.A. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.41, p. 127-134, 1994.

BARUTA, D.A.; ARDOINO, S.M.; RIESCO, N.R.; MARENGO, M.L.; BRANDAM, J.L.; ORIANI, D.S. Determinación de anticuerpos prevalentes contra brucelas específicas e inespecíficas en caninos en la ciudad de Gral. Pico (La Pampa). *Selec. Vet.*, v. 9, p. 415, 418, 2001.

CARMICHAEL, L.E. Abortion in 200 Beagles (News Report). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 149, p.1126, 1966.

CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. *Theriogenology*, v.6, p.106-116, 1976.

CARMICHAEL, L.E. *Brucella canis*. In: Animal Brucellosis. In: Nielsen K.; Duncan J.R. ed. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 335-350, 1990.

CARMICHAEL, L.E.; BRUNER, D.W. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet.*, v. 58, p. 579-592, 1968.

CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.156, p. 1726-1734. 1970.

CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell vet.* v.78. p.63-73, 1988.

CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine Brucellosis In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1990. p.573-584.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Inf. Dis.*, v. 3, p. 213-221, 1997.

CORTES, V.A.; OLIVEIRA, M.C.G.; ITO, F.H., VASCONCELOS, S.A. Reações sorológicas para *Brucella canis* em cães errantes capturados na proximidade dos parques públicos, reservas florestais e em áreas periféricas do município de São Paulo-Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v. 25, n. 1, p. 101-107, 1988.

DIAZ, R.; JONES, L.; WILSON, J.B. Antigenic relationship of the Gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough *Brucellae*. *J. Bacteriol.*, v.95, p.618-624, 1968.

EBANI, V.V.; CERRI, D.; FRATINI, F.; BEY, R.F.; ANDREANI, E. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. *New Microbiol.*, v.26, p. 65-73, 2003.

FERREIRA, T.; GOMES, M.P.J.; RONCONI, M.A.; AQUINO, M.H.C.; TORRES, H.M.; MANDELBAUM, M.A.; FIGUEIREDO, M.J. Brucelose canina: ocorrência em um canil comercial. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 27, p. 555-556, 2003.

Brucelose canina

FIGUEIREDO, M.J.; GOMES, M.J.P.; RONCONI, M.A.; AQUINO, M.H.C.; TORRES, H.M.; BUZI, K.A.; FERREIRA, T. Brucelose canina: obtenção de抗énios e avaliação pela técnica de imunodifusão em gel de ágar. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 27, p. 554-555, 2003

FLORES-CASTRO, R.; SEGURA, R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *Cornell Vet.*, v.66, p.347-352, 1976.

GARCIA-CARRILLO, C. Laboratory animal models for Brucellosis studies. In: Nielsen K.; Duncan J.R. ed. Animal Brucellosis. Boca Raton, CRC Press, p. 423-442, 1990.

GEORGE, L.W.; CARMICHAEL, L.E. Development of a rose bengal-stained plate-test antigen for the rapid diagnostic of *Brucella canis* infection. *Cornell Vet.*, v.68, p.530-543, 1978.

GEORGE, L.W.; DUNCAN, J.R.; CARMICHAEL, L.E. Semen examination in dogs with canine brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* v.40, p. 1589. 1979.

GERMANO, P.M.L.; VASCONCELOS, S.A.; ISHIZUCA, M.M.; PASSOS, E.C.; ERBOLATO, E.B. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campinas- SP, Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v. 25, p. 27-34, 1987.

GODOY, A.M.; PERES, J.N.; BARG, L. Isolamento de *Brucella canis* em Minas Gerais, Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, v. 29, p. 35 - 42, 1977.

GODOY, A.M., NEVES, J., PERES, J.N., BARG, L. Sobre Um caso de infecção humana por *Brucella canis* em laboratório. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 31, p. 141-145, 1979.

HENDERSON, R.A.; HOERLEIN, B.F.; KRAMER, T.T.; MEYER, M.E. Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.165, p.451-455. 1974.

JENNINGS, P.B., CRUMRINE, M.H., LEWIS, G.E., FARIS, B.L. The effect of a two-state antibiotic regimen on dogs infected with *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 164, p. 513-514, 1974.

JOHNSON, C.A.; WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.14, p.763-773, 1992.

KEID, L.B.; SOARES, R.M.; MORAIS, Z.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; VACONCELLOS, S.A. *Brucella* spp. isolation from dogs commercial breeding kennels in São Paulo, Brazil. *Bras. J. Microbiol.*, v. 35, p. 161-166, 2004.

KERWIN, S.C., LEWIS, D.D., HRIBERNIK, T.N.; PARTINGTON, B., HOSGOOD, G., EILTS, B.E. Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 201, p. 1253-1257, 1992.

von KRUEDERIER, R.B. Isolierung und Bestimmung von *Brucella canis* aus einem Beaglebestand. *Zentralbl Veterinaermed [B]*, v.21, p.307-310, 1974.

LARSSON, M.H.M.A., LARSSON, C.E.; MIRANDOLA, R.M.S.; YASSUDA, P.H.; GRUTOLLA, G. Canine brucellosis in São Paulo: serologic survey of kennel and stray dogs. *Int. J. Zoon.*, v. 8, p. 85-90, 1981.

LARSSON, M.H.M.A., LARSSON, C.E.; FERNANDES, W.R., COSTA, E.O.; HAGIWARA, M.K. *Brucella canis*: inquérito sorológico bacteriológico em população felina. *Rev. Saude Pub.*, v. 18, p. 47-50, 1984.

LUCERO, N.E.; ESCOBAR, G.I.; AYALA, S.M.; LOPEZ, G. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J. Med. Microbiol.*, v.51, n.8, p.656-660, 2002.

MAIA, G.R.; ROSSI, C.R.S.; ABBADIA, F.; VIEIRA, D.K.; MORAES, I.A. Prevalência de brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói-RJ. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23, p. 425-427, 1999.

MARASSI, C.D.; MORAES, I.A.; LILENBAUM, W. Comparação entre抗énios de *B. canis* e de *B. ovis* para o diagnóstico da brucelose canina em testes de imunodifusão em gel-agarose. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 28, p. 103-107, 2004.

MELO, S.M.B., AGUIAR, P.H.P.; NASCIMENTO, R.M.; FREIRE, S.M. Avaliação sorológica por imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de *Brucella canis* em cães no distrito de Monte Gordo – Camaçari – Bahia. *Arq. Esc. Med. Vet. UFBA*, v. 19, p. 119-127, 1997/98.

MEGID, J.; BRITO, A.F.; MORAES, C.C.G.; FAVA, N.; AGOTTANI, J. Epidemiological assessment of canine brucellosis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 51, p. 439-440, 1999.

MOLNAR, L.; MOLNAR, E.; CARVALHO, M. Capacidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico de brucelose canina. *Hora Veterinária*, v. 21, p. 45-49, 2001.

MORAES, C.C.G.; MEGID, J.; SOUZA, L.C.; CROCCI, A.J. Prevalência de brucelose canina na microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v. 69, p. 7-10, 2002a.

MORAES, I.A.; LARANJA, H.F.; VIEIRA, D.K.; LOPES, S.P.; FREAZA, A.; MELO, G.; PENCHEL, V. Identificação de cães potencialmente transmissores de brucelose na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Cienc. Vet.*, v. 9, p. 154-157; 2002b.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 209-227, 2002b.

MORSE, E. V. Canine Brucellosis – A Review of the Literature. *J.A.V.M.A.*, v.119, p.304-308, 1951.

MYERS, D.M.; VARELA-DIAZ, V.M. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection in stray dogs in Moreno, Argentina. *Cornell Vet.*, v.70, p.258-265, 1980.

NICOLETTI, P.; CHASE, A. The use of antibiotics to control canine brucellosis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.9, p.1063-1066, 1987.

NICOLETTI, P. Further studies on the use of antibiotics in canine brucellosis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.13, p.944-947, 1991.

PERES, J.N.; GODOY, A.M.; BARG, L.; COSTA, J.O. Isolamento de *Brucella canis* de carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*). *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, v. 33, p. 51-55, 1981.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; LAGE, A.P. Diagnóstico da brucelose bovina. *Cad. Tec. Med. Vet. Zoot.*, v. 47, p. 13 - 29, 2005.

POLLOCK, R.H.V. Canine brucellosis: current status. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.1, p. 255 - 267, 1979.

POLT, S.S.; DISMUKES, W.E.; FLINT, A.; SHAEFER, J. Human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Ann. Intern. Med.*, v. 97, p. 717 - 719, 1982.

RHANDHAWA, A.S.; DIETRICH, W.H.; HUNTER, C.C.; KELLY, V.P.; JOHSON, T.C.; SVOBODA, B.; WILSON, D.F. Prevalence of seropositive reactions to *Brucella canis* in a limited survey of domestic cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 171, p. 267-268, 1977.

SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y.; FUJIWARA, K. Ocular lesions in experimental canine brucellosis. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v. 39, p. 181 - 185, 1977.

SANDOVAL, L. A.; RIBEIRO, L. O. C.; AMARAL, L. B. S. Incidência da brucelose canina na cidade de São Paulo. *Biológico*, v. 42, p. 128 - 132, 1976.

SANTA ROSA, C.A.; BATISTA JUNIOR, J.A.; TERUYA, J.M.; YNAGUITA, R.M. Inquérito sorológico para leptospirose e brucelose em cães da cidade de Belo Horizonte. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 26, p. 339-342, 1974.

SCHIEMPER, S.R.M.; VAZ, A.K. Inquérito sorológico para brucelose canina por *Brucella canis* na região do Planalto Catarinense. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 12, p. 8-12, 1990.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v. 41, p. 607-616, 1979.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; YAMADA, J.; TAKADA, H. Spermagglutination and spermagglutinating activity of serum and tissue extracts from reproductive organs in male dogs experimentally infected with *Brucella canis*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v. 43, p. 469-490, 1981.

Brucelose canina

SERIKAWA, T.; IWAKI, S.; MORI, M.; MURAGUCHI, T. YAMADA, J. Purification of *Brucella canis* cell wall antigen using immunosorbent assay for specific diagnosis of canine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p.837-842, 1989.

SHIN, S., CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. [online]. New York: International Veterinary Information Service, 23 Nov 1999. In: Carmichael, L.E. (Ed) Recent advances in canine infectious disease. <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/shin/chapter_frm.asp?LA=1>. Document No. A0101.1199

SOUZA, L.A., VIANA, R.C.A., MICHALICK, M.S.M., REIS, J.K.P., LAGE, A.P. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte - MG. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 24, p. 127-131, 2002.

SRINIVASAN, V.K.; NEDUNCHELLIYAN, S.; VENKATARAMAN, K.S. Seroepidemiology of canine brucellosis in Madras City. *Indian Vet. J.*, v.69, p.978-980, 1992.

SWENSON, R.M., CARMICHAEL, L.E., CUNDY. Human infection with *Brucella canis*. *Ann. Intern. Med.*, v. 76, p.435 - 438, 1972.

TAYLOR, D.J.; RENTON, J.P.; McGREGOR, A.B. *Brucella abortus* Biotype I as a cause of abortion in a bitch. *Vet. Rec.* v.96, p.428-9, 1975.

TAYLOR, D.J. Serological evidence for the presence of *Brucella canis* infection in dogs in Britain. *Vet. Rec.*, v.2, p.102-104, 1980.

VARGAS, A.C.; LAZZARI, DUTRA, V.; POESTER, F.P. Brucelose canina: Relato de caso. *Ciencia Rural*, v.26, p.305-308, 1996.

VIEIRA, D.K.; MORAES, I.A.; ROSSI, C.R.S.; RAMOS, M.L.M.; BARRETO, L.S. Identificação de cães reagentes à *Brucella canis* em ambientes rural e urbano no estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. de Cienc. Vet.*, v. 7, p. 123, 2000.

WALD, V.B.; FERNANDES, J.C.T. Sorologia da brucelose canina no município de Porto Alegre, RS. *Arg. Fac. Vet. Univ. Fed. R. G. do Sul*, v. 4-5, p. 93-95, 1977.

WANKE, M.M. Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 195-207, 2004.

WANKE, M.M., MONACHESI, N.E., LOZA, M.E., RUTTER, B., BALDI, P.C., FOSSATI, C.A. Determinación de anticuerpos contra proteínas citoplasmáticas de *Brucella* por ELISA para la detección de casos crónicos de brucellosis canina. *Selec. Vet.*, v. 8, 308-311, 2000.

WOOLEY Jr., R.E., BROWN, J., SHOTTS, E.B., BLUE, J.L., DREESEN, D.W. Serosurvey of *Brucella canis* antibodies in urban and rural stray dogs in Georgia. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v. 72, p. 1581-1584, 1977.

WYCKOFF III, J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 395-415, 2002.

YAMAUCHI, C.; SUZUKI, T.; NOMURA, T., KUKITA, Y., IWAKI, T., KAZUNO, Y., GHODA, A. Canine brucellosis in a beagle breeding colony. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v.36, p.175-182, 1974.

YING, W., HGUYEN, M.Q., JAHRE, J.A. *Brucella canis* endocarditis: case report. *Clin. Infect. Dis.*, v. 29, p. 1593-1594, 1999.

ZAMORA, J., ALONSO, O., MARTIN, R. Brucellosis canina en Valdivia, Chile. Estudio serológico e bacteriológico en perros de ciudad. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, v. 27, p. 149-153, 1980.

ZOHA, S.J.; CARMICHAEL, L.E. Properties of *Brucella canis* surface antigens associated with colonial mucoidness. *Cornell Vet.*, v. 71, p. 428 - 438, 1981.

ZOHA, S.J.; CARMICHAEL, L.E. Properties of cell wall antigens of virulent *Brucella canis* and a less mucoid variant of reduced pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.*, v. 43, p. 171 - 174, 1982a.

ZOHA, S.J.; CARMICHAEL, L.E. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.*, v., 7, p. 35-50, 1982b.

ZOHA, S.J.; WALSH, R., Effect of a two-stage antibiotic treatment regimen on dogs naturally infected with *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 180, p. 1474-1475, 1982.

BRUCELOSE: ZOONOSE E BIOTERRORISMO

Renato de Lima Santos¹

Fabiana Lessa Silva²

Tatiane Alves da Paixão³

Luis Ernesto Samartino⁴

1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

Na noite de 24 para 25 de agosto do ano de 79 depois de Cristo, ocorreu uma erupção do Monte Vesúvio que resultou na morte de toda a população das cidades de Pompeia e Herculano. Quase dois mil anos mais tarde, ao examinar os esqueletos de indivíduos da população de Herculano, ou seja, esqueletos de cidadãos da Roma Antiga, Capasso (1999, 2002) observou lesões ósseas sugestivas de infecção brucelica. Ainda mais intrigantes foram seus achados ao examinar ultraestruturalmente um queijo remanescente daquela época, no qual foram encontradas evidências inequívocas de contaminação por microorganismos com morfologia compatível com *Brucella*

¹Méd.Vet., PhD, Prof. Adj. DCCV, Esc. de Vet. Da UFMG.

²Méd.Vet., MMV, Doutoranda

³Méd.Vet., Mestranda

⁴Méd. Vet., PhD. INTA, Centro de Ciencias Vet. y Agron. - Inst. Patobiología, Las Cabañas y Los Reseros, Argentina.

spp. Sabe-se que a população do entorno do Monte Vesúvio daquela época, se valia do leite de pequenos ruminantes como sua principal fonte protéica. Estes achados demonstram claramente que a Brucelose é uma zoonose que pode ser tão antiga quanto a relação entre o homem e os animais domésticos.

Apesar das evidências bastante antigas da doença, a brucelose somente foi reconhecida como zoonose no final do século IXX. Em 1887, o Coronel David Bruce, médico do exército Britânico, isolou, do baço de soldados britânicos residentes em Malta, uma bactéria que foi denominada *Micrococcus melitensis*. Naquela época os pacientes hospitalizados recebiam leite cru de cabra como parte do tratamento. Em 23 de setembro de 1905, chegou a Nova York um navio, o SS Joshua Nicholson, com 60 cabras provenientes de Malta. Praticamente todos os tripulantes ingeriram leite destas cabras durante a viagem e dentro de poucas semanas vários ficaram doentes. As cabras foram então mantidas em quarentena. Um dos tripulantes do navio, um agente da inspeção e uma mulher que bebeu leite das cabras em quarentena, também desenvolveram sintomas da "Febre do Mediterrâneo". Dr. David Bruce já havia advertido as autoridades americanas sobre o risco de "Febre do Mediterrâneo" em consequência da importação de cabras de Malta. O *Micrococcus melitensis* foi mais tarde renomeado como *Brucella melitensis* em homenagem ao Dr. Bruce (Moreno & Moriyón, 2002; Nicoletti, 2002).

Em 1895, o Professor Benhard Bang, patologista veterinário e bacteriologista dinamarquês, descreveu um agente isolado de bovinos que foi chamado de *Bacillus*

abortus. Em 1914, foi isolada de fetos suínos abortados nos Estados Unidos, uma espécie nova de *Brucella*, que foi nomeada *B. suis*. Durante esse período, o gênero *Brucella* passou a ser reconhecido em vários países do mundo (Nicoletti, 2002).

Desde então a brucelose tem sido controlada ou mesmo erradicada com maior ou menor eficiência em vários países e devido a sua natureza zoonótica, programas eficazes de controle da doença nos animais domésticos invariavelmente resultam em declínio no número de infecções no homem. Apesar dos avanços significativos no estudo da doença e do agente, a brucelose é, ainda hoje, considerada por organismos internacionais como a zoonose mais difundida no mundo (Gil & Samartino, 2000).

2. POTENCIAL ZOONÓTICO DAS ESPÉCIES DE *Brucella* sp.

O gênero *Brucella* é dividido em seis espécies, nomeadas conforme seu hospedeiro preferencial e com alto grau de homologia entre si. Cada uma destas espécies de *Brucella* é adaptada a um hospedeiro mamífero específico, mas não exclusivo (Boschioli et al., 2001; Moreno & Moriyón, 2001). Quatro das seis espécies de *Brucella* – *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* – são reconhecidamente capazes de infectar o homem em condições naturais. *B. melitensis* e *B. suis* são as espécies mais patogênicas, enquanto *B. abortus* é considerada de patogenicidade moderada e *B. canis* de baixa patogenicidade para o homem (Hartigan, 1997). Não há relatos de infecção humana por *B. ovis* e *B. neotomae*.

Além destas espécies de *Brucella*, existem outras que infectam mamíferos marinhos e que ainda encontram-se sem classificação definitiva. Tem sido proposta a expansão do gênero *Brucella* com a classificação destas cepas isoladas de mamíferos marinhos em uma espécie – *B. maris* – ou em duas espécies – *B. pinnipediae* e *B. cetaceae* (Jahans et al., 1997; Cloeckaert et al., 2001 e 2003). Foi descrito um caso de infecção accidental em laboratório (Brew et al., 1999) e, recentemente, foram descritos dois casos de infecção natural com amostras de *Brucella* oriundas de mamíferos marinhos. Estes dois casos de infecção natural resultaram em alterações neurológicas nos pacientes humanos (Sohn et al., 2003).

Embora haja relatos de brucelose humana e animal causada por *B. melitensis* na América do Sul, esta espécie de *Brucella* é considerada exótica no Brasil, não havendo, no País, registros de brucelose humana ou animal causada por *B. melitensis* (Gil & Samartino, 2000).

3. FONTES DE INFECÇÃO E GRUPOS DE RISCO

A forma mais comum de transmissão da brucelose para a população em geral é o consumo de leite contaminado não pasteurizado e de queijos preparados com leite cru (Gür et al., 2003; Namiduru et al., 2003). Apesar do conhecimento acerca da epidemiologia e vias de transmissão da doença ser bastante antigo, surtos resultantes do consumo de leite contaminado continuam ocorrendo (Martínez et al., 2003). Um estudo realizado na Grécia demonstrou que apesar da maior conscientização da população sobre o risco de aquisição de zoonoses e

seus meios de transmissão, o número de casos de brucelose e de outras zoonoses não tem diminuído (Antoniou et al., 2002).

A brucelose humana também pode ser considerada uma doença ocupacional, uma vez que profissionais que trabalham em contato direto com animais têm maior risco de contrair a doença. No caso do médico veterinário e de criadores, além da exposição a material resultante de abortamento e secreções de animais infectados, que são a forma mais importante de contágio (Mahajan et al., 1986), ocorrem casos de infecção accidental por amostras vacinais com potencial patogênico para o homem (Berkelman, 2003). Diante deste cenário, cabe ao médico veterinário orientar o pessoal envolvido com o manejo de bovinos para evitar contato direto com placenta ou fetos abortados. Os fetos abortados devem ser incinerados, evitando-se contato manual sem uso de luvas. As vias de infecção nos casos de contato direto com animais infectados são: conjuntival, respiratória ou por penetração do agente através de lesões cutâneas. Os abatedouros são um ambiente propício para a ocorrência de infecção ocupacional, uma vez que, além dos operários trabalharem em contato direto com as carcaças, o ambiente do abatedouro favorece a formação de grande quantidade de aerossóis que podem potencialmente transmitir o agente. Estas condições resultam em frequente exposição dos trabalhadores de abatedouros ao agente, particularmente em áreas endêmicas (Barbuddhe et al., 2000). Há também relatos de casos de infecção de indivíduos que trabalham com empacotamento de carne (Landau e Green, 1999), o que pode ter importância em nosso meio, uma vez

que um estudo no Brasil demonstrou que grande parte dos suínos abatidos clandestinamente são soropositivos para *Brucella* (Freitas et al., 2001).

Transmissão de brucelose em laboratórios de pesquisa e de diagnóstico é bem documentada na literatura (Arlett, 1996), tendo sido relatado até mesmo a ocorrência de surtos de brucelose em pessoal de laboratório (Martin-Mazuelos et al., 1994; Fiori et al., 2000; Memish & Mah, 2001). Um aspecto importante da transmissão laboratorial é que não necessariamente estes casos estão associados à ocorrência de acidentes. Aparentemente, os aerossóis formados por práticas microbiológicas rotineiras é uma forma comum de infecção (Martin-Mazuelos et al., 1994). Brucelose é a infecção bacteriana laboratorial mais comum, por isso, há necessidade de precauções na manipulação do agente, principalmente em laboratórios de pesquisa, onde ocorrem a maioria dos acidentes. O Centers for Disease Control and Prevention e o National Institutes of Health dos Estados Unidos, recomendam a utilização de nível 3 de biosegurança para a manipulação de culturas ou para procedimentos experimentais envolvendo *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis*. O nível 3 de biosegurança compreende a adoção de procedimentos e o uso de equipamentos de segurança visando prevenir a infecção laboratorial, particularmente através de aerossóis (Richmond & McKinney, 1993).

Sorologia positiva para *B. canis* é maior em grupos com maior contato com cães e também em indivíduos com febre de origem desconhecida, indicando que *B. canis* tem potencial zoonótico, particularmente para pessoas em contato

frequente com cães (Monroe et al., 1975). Além disso, casos naturais de brucelose humana por *B. canis* também foram associados ao contato com cão portador (Munford et al., 1975). No Brasil, foram encontradas evidências sorológicas da infecção em cães (Moraes et al., 2002), bem como pessoas soropositivas para *B. canis* (Larsson, 1980). Outras formas menos freqüentes de transmissão incluem transfusão de sangue (Doganay et al., 2001; al-Kharfy, 2001) e transplante de medula óssea (Ertem et al., 2000). Transmissão transplacentária (Giannacopoulos et al., 2002), transmissão por contato sexual (Ruben et al., 1991) e através do leite materno (Palanduz et al., 2000), no caso da mãe estar infectada, também têm sido incriminadas como formas potenciais de transmissão direta entre seres humanos. Em resumo, a maioria dos casos de brucelose humana é causada por *B. melitensis* devido à ingestão de leite e produtos lácteos não-pasteurizados, principalmente de pequenos ruminantes e de camelo. Os casos humanos de infecção por *B. suis* geralmente afetam indivíduos que trabalham com abate de suínos. A infecção por *B. abortus* ocorre com maior freqüência como doença ocupacional afetando particularmente criadores de gado leiteiro. A infecção humana por *B. canis* está geralmente associada ao contato freqüente com cães portadores. Independentemente da espécie de *Brucella*, o risco de infecção accidental em laboratório é elevado.

4. BRUCELOSE HUMANA

4.1. Epidemiologia

Conforme detalhado acima, a ocorrência de brucelose humana está diretamente

relacionada com o consumo de alimentos contaminados ou contato com animais portadores. Por isso, o controle da brucelose nos animais domésticos resulta indiretamente no controle da doença humana. De tal forma que, nos países onde a doença foi controlada ou mesmo erradicada nos animais, houve diminuição acentuada do número de casos humanos. No caso dos EUA, a brucelose humana que há algumas décadas estava associada com grupos de pessoas com maior contato com animais, passou recentemente a ser vista como uma doença importante somente na população de imigrantes (Fosgate et al., 2002; White & Atmar, 2002). Na Austrália, os casos de brucelose humanos causados por *B. abortus* sofreram redução drástica devido ao programa efetivo de erradicação da brucelose bovina, mas a brucelose humana causada por *B. suis* está reemergindo em grupos envolvidos com a caça e abate de porcos (Robson et al., 1993).

A cada ano são relatados oficialmente para a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente, 500.000 casos de brucelose humana. Sabe-se que este número é subestimado, particularmente em algumas regiões do mundo. A doença é endêmica na região mediterrânea, inclusive na Turquia, na Ásia, particularmente na península arábica e no subcontinente indiano e na América Latina (Hartigan, 1997; Geyik et al., 2002). Na Europa, o número de casos de brucelose humana é extremamente variável entre os países. De uma maneira geral, os países do norte da Europa são praticamente livres de brucelose animal e, consequentemente, os casos humanos geralmente são importados do sul. Já no Sul da Europa, particularmente na região mediterrânea

(principalmente Grécia, Espanha, Itália e França) a brucelose é endêmica, com grande número de casos humanos registrados oficialmente, embora, recentemente, programas de controle da brucelose animal têm resultado na diminuição do número de casos da doença no homem (Godfroid & Käsbohrer, 2002). Na Arábia Saudita, a brucelose humana é considerada hiperendêmica, com 19,2% da população com evidência sorológica de exposição a *Brucella* e 2,3% da população com brucelose clínica (Alballa, 1995). Outros países árabes com alta incidência de brucelose humana são o Irã, a Autoridade Palestina, a Síria, a Jordânia e Oman, embora menor número de casos ou soroprevalência de brucelose humana também tenham sido relatados na Argélia, Chad, Djibouti, Egito, Emirados Árabes Unidos, Etiópia, Iraque, Israel, Kuwait, Líbano, Líbia, Marrocos, Somália, Sudão, Tunísia, e Yemen (Refai, 2002). Na Índia, a soroprevalência na população humana varia de 0,9 a 18,1%, com grande número de casos de brucelose humana por *B. melitensis* (Renukaradhya et al., 2002). Na China, a brucelose humana tem sido diagnosticada desde o início do século passado, mas recentemente, apesar de não ter havido alteração significativa da prevalência da doença nos animais, tem ocorrido aumento no número de casos de brucelose humana, principalmente a partir de 1995 (Deqiu et al., 2002). Na América Latina, têm sido relatados casos de brucelose humana por *B. melitensis* no México, Peru e Argentina (Gil e Samartino, 2000). A brucelose foi inicialmente descrita no México no início do século passado e é considerada endêmica naquele País, onde 93% dos casos humanos são resultantes de infecção

com *B. melitensis* de origem caprina, 5% com *B. melitensis* de origem bovina, 1,5% com *B. abortus* de origem bovina e 0,5% com *B. suis* de origem bovina (Luna-Martínez e Mejía-Térán, 2002). Na América central, os dados sobre brucelose humana são extremamente escassos, contudo existem alguns relatos oficiais de casos humanos devido a infecção por *B. abortus* na Costa Rica (Moreno, 2002). Na Venezuela, já foram isoladas *B. suis* e *B. melitensis*, mas, aparentemente, a maioria dos casos de brucelose humana se manifesta como doença ocupacional em consequência da infecção por *B. abortus* (Vargas O., 2002). Na Argentina, o primeiro caso de brucelose humana por *B. melitensis* foi relatado em 1922, e desde então têm sido registrados vários casos humanos devido a infecção por *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* (Samartino, 2002). No Paraguai, há relatos de brucelose humana causada por *B. melitensis* e *B. abortus* (Baumgarten, 2002). *B. melitensis* é considerada exótica no Brasil e a ocorrência de brucelose humana causada por outras espécies de *Brucella* não é bem documentada, havendo apenas relatos isolados e esporádicos de casos da doença no homem (Ferreira et al., 2002; Poester et al., 2002). Contudo, levantamentos epidemiológicos realizados no Brasil indicam que a soroprevalência da brucelose humana por *B. abortus* é baixa (Baruffa, 1978) e que a importância da doença é principalmente ocupacional (Spinola & Costa, 1972; Oliveira et al., 1999; Lacerda et al., 2000). A situação em outros Países da América Latina não é bem conhecida.

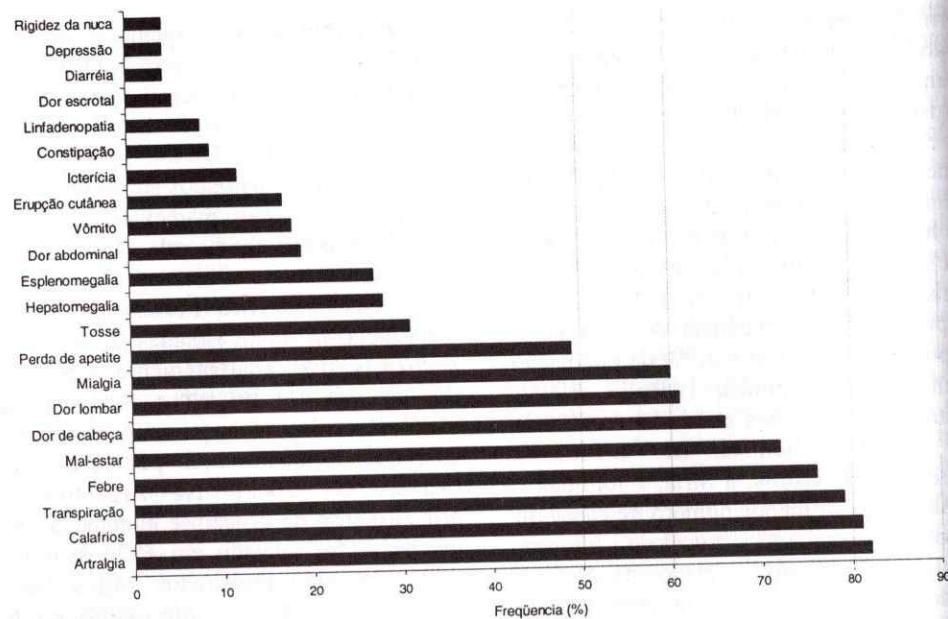


Figura 1. Freqüência de sintomas e sinais clínicos em casos de brucelose humana. Adaptado de Gür et al., 2003.

4.2. Clínica

A brucelose afeta principalmente jovens e adultos de meia-idade, com menor número de casos entre crianças e idosos (Geyik et al., 2002). Os principais sintomas e sinais clínicos observados nos casos de brucelose humana estão summarizados na Figura 1

A brucelose no homem geralmente se apresenta como uma doença febril sem outros sintomas específicos. Contudo, em 20 a 40% dos casos ocorrem complicações envolvendo diversos órgãos e sistemas (Colmenero et al., 2002). Dentre estas complicações, 20-85% dos casos correspondem a alterações músculo-esqueléticas (principalmente espondilitite, sacro-ilite, poliartrite e tenossinovite); 12,5-26% correspondem a alterações oculares (conjuntivite, ulveite,

dacroadenite e episclerite); 13-17% a alterações dermatológicas (principalmente placas, pápulas e erupções cutâneas); 1,5-8% a alterações geniturinárias (principalmente orquite e epididimite, mas também pielonefrite e prostatite); 1,7-7% a alterações neurológicas; 5-6,8% a alterações respiratórias (bronquite, pneumonia e efusão pleural); 4% a alterações hematológicas (principalmente trombocitopenia e pancitopenia); 2-5% a alterações gastrointestinais (hepatite, ileite e ascite); 1-1,5% a endocardite; 1% a sepsis e <1% a abscessos hepáticos e esplênicos, embora, em aproximadamente 30% dos casos ocorra hepato ou esplenomegalia (Colmenero et al., 1996 e 2002; Memish & Venkatesh, 2001; Metin et al., 2001; Navarro-Martínez et al., 2001; Geyik et al., 2002; Güngör et al. 2002; Shaalan et al.,

2002; Gür et al., 2003; Namiduru et al., 2003; Pappas et al., 2003). Em aproximadamente um quarto dos casos em que ocorrem complicações, o indivíduo pode apresentar mais de um tipo de alteração (Gür et al., 2003). Outras formas de apresentação clínica menos comuns também têm sido relatadas, como endoflebite (Memish et al., 2001), colecistite (Miranda et al., 2001), púrpura trombocitopênica (Young et al., 2000), pseudo-aneurismas (Bergeron et al., 1992; Harman et al., 2004), abscessos ovarianos (Penkci et al., 2003; Seoud et al., 2003), abscessos mamários (Cokca et al., 1999), entre outras (Tab. 1). Estas apresentações clínicas podem ou não estar associadas às formas mais comuns descritas acima. Várias manifestações clínicas da brucelose humana estão summarizadas na Tabela 1.

Ao contrário do que ocorre com os animais domésticos, nos quais o aborto é a principal manifestação da infecção por *Brucella*, este agente não é uma causa comum de aborto na espécie humana. Aparentemente, o risco de uma mulher gestante abortar em consequência de infecção por *Brucella* associada a febre, não é diferente do risco de aborto em consequência de outras infecções bacterêmicas (Hartigan, 1997), embora existam relatos de placentite associada a parto prematuro (Malone et al., 1997) e transmissão congênita da infecção (Giannacopoulos et al., 2002).

4.3. Diagnóstico

Dada a variação na manifestação clínica da brucelose humana, o diagnóstico obrigatoriamente depende de exames laboratoriais. O diagnóstico definitivo é

baseado no isolamento e tipificação do organismo (Yagupsky, 1999). Considerando-se que *Brucella* é um organismo de crescimento lento, os métodos automáticos de monitoramento contínuo de hemoculturas têm diminuído o tempo requerido para isolamento do organismo (Gamazo et al., 1993; Yagupsky, 1994; Bannatyne et al., 1997; Ruiz et al., 1997; Yagupsky et al., 1997). Este sistema automatizado também é eficiente para o isolamento de *Brucella* spp. a partir do líquido sinovial (Yagupsky et al., 2001). Tendo em vista a demora para o isolamento do agente e a dificuldade ou impossibilidade de isolamento em determinados casos, evidências sorológicas da infecção associadas a sinais e sintomas clínicos compatíveis com a doença, são aceitas para o diagnóstico definitivo de brucelose humana.

Vários métodos sorológicos foram desenvolvidos para a pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* (Lucero & Bolpe, 1998; Lucero et al., 1999; Smits et al., 1999; Orduña et al., 2000). Recentemente, vários protocolos para detecção de *Brucella* spp. por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm sido propostos (Romero et al., 1995; Queipo-Ortuño et al., 1997; Morata et al., 1998). Embora ainda não sejam de uso rotineiro, estes métodos moleculares provavelmente terão grande aplicação no futuro, particularmente para acompanhamento pós-terapêutico e detecção precoce de recrudescimento da infecção (Morata et al., 1999). Além da rapidez, a técnica de PCR tem apresentado sensibilidade muito maior do que o isolamento do agente em várias formas de apresentação clínica da brucelose humana (Morata et al., 2001) e um outro aspecto

Tabela 1. Relatos recentes de várias manifestações clínicas da brucelose humana*.

Manifestação clínica	Agente **	Casos	País	Referência
Espondilodiscite	<i>Brucella</i> spp.	1	Brasil	Ferreira et al (2002)
Osteoartrite	<i>B. melitensis</i> , <i>Brucella</i> spp.	431	Turquia, Espanha, Israel e Itália	Yorgancigil et al. (2003), Gür et al. (2003), Weil et al. (2003), Geyik et al. (2002), Malavolta et al. (2002), Solera et al. (1999), Ibero et al. (1997)
Epididimite e orquite	<i>B. melitensis</i> , <i>Brucella</i> spp.	132	Espanha, Arábia Saudita, Turquia e Grécia	Gür et al. (2003), Cesur et al. (2002), Kadikoylu et al. (2002), Papatsoris et al. (2002), Navarro-Martínez et al. (2001), Memish & Venkatesh (2001).
Lesões cutâneas	<i>Brucella</i> spp.	63	Turquia	Gür et al. (2003), Metin et al. (2001).
Pneumonia e efusão pleural	<i>Brucella</i> spp., <i>B. melitensis</i>	44	Macedonia e Turquia	Pappas et al. (2003), Gür et al. (2003)
Meningo-encefalite	<i>Brucella</i> spp., <i>B. melitensis</i>	37	Turquia, Espanha, Índia, EUA ^{1,2}	Gür et al. (2003), Bodur et al. (2003), Sohn et al. (2003), Samdani & Patil (2003), Seidel et al. (2003), Martinez-Chamorro et al. (2002), Lorido et al. (2001).
Endocardite	<i>Brucella</i> spp.	14	Espanha e Turquia	Reguera et al. (2003), Gür et al. (2003), Kula et al. (2001)
Hepatite e colecistite	<i>Brucella</i> spp., <i>B. melitensis</i> e <i>B. suis</i>	12	Espanha, Turquia e Grécia	Gür et al. (2003), Andriopoulos et al. (2003), Miranda et al. (2001).
Tombocitopenia e pancitopenia	<i>Brucella</i> spp.	11	Turquia	Gür et al. (2003)
Abscessos esplênicos e hepáticos	<i>B. melitensis</i> , <i>Brucella</i> spp.	8	Espanha e França	Colmenero et al. (2002), Sisteron et al. (2002).
Abscesso epidural	<i>Brucella</i> spp.	4	Espanha	Pina et al. (2001)
Ascite	<i>Brucella</i> spp.	4	Turquia e Grécia	Gür et al. (2003), Akrigidis & Pappas (2001)
Pielonefrite	<i>Brucella</i> spp.	3	Turquia	Gür et al. (2003)
Episclerite	<i>B. melitensis</i>	3	Turquia	Güngör et al. (2001)
Púrpura trombocitopênica	<i>B. melitensis</i> , <i>Brucella</i> spp.	3	Grécia, Turquia e EUA ³	Tsirka et al. (2002), Young et al. (2000)
Sepsis	<i>Brucella</i> spp.	3	Turquia	Gür et al. (2003)
Abscesso tubo-ovário e ovariano	<i>B. melitensis</i> , <i>Brucella</i> spp.	2	Líbano, Turquia	Seoud et al. (2003), Fenkci et al. (2003)
Peritonite, Ileite	<i>B. melitensis</i>	2	Turquia	Erbay et al. (2003), Gencer & Ozer (2003), Gür et al. (2003)
Pseudoaneurisma	<i>B. melitensis</i>	2	Turquia e França	Harman et al. (2004), Bergeron et al. (1992)
Abscessos mamários bilaterais em gestante	<i>B. melitensis</i>	1	Turquia	Cokca et al. (1999)
Infecção congênita	<i>B. abortus</i>	1	Grécia	Giannacopoulos et al. (2002)
Endoflebite	<i>Brucella</i> spp.	1	Arábia Saudita	Memish et al. (2001)
Tiroidite	<i>B. melitensis</i>	1	Itália	Vermiglio et al. (1995)

* As informações apresentadas se referem a uma amostragem dos relatos mais recentes da doença, sem a pretensão de sumarizar toda a literatura pertinente. ** A maior parte dos casos em que foi apresentado o nome genérico *Brucella* spp., provavelmente correspondem a infecções por *B. melitensis*, mas a identificação definitiva do agente não foi concluída, ou o diagnóstico foi baseado em sorologia. *** No relato de Sohn et al. (2003), *Brucella* spp. se refere a amostras comprovadamente de origem de mamíferos marinhos. ¹ Imigrantes do Peru. ² Imigrante do Irã. ³ Imigrante do México.

que pode melhorar a aplicação prática desta técnica é o fato de se obter ótima sensibilidade com a utilização de amostras de soro (Zerva et al., 2001). O detalhamento destes métodos está além do escopo desta revisão. Os métodos de diagnóstico da brucelose em animais doméstico foram detalhados por Poester et al. (2004, neste volume).

4.4. Tratamento

Em 1986, a Organização Mundial da Saúde recomendou a combinação de doxaciclina e rifampicina por seis semanas para o tratamento da brucelose humana (Arlett, 1996). Contudo, outras combinações como ofloxacín e rifampicina (Akova et al., 1993), doxaciclina e estreptomicina (Colmenero et al., 1994; Malik, 1998), gentamicina e cotrimoxazole, rifampicina e cotrimoxazole, rifampicina e tetraciclina, doxaciclina e cotrimoxazole, tetraciclina e cotrimoxazole, tetraciclina e estreptomicina (Malik, 1998), doxaciclina e gentamicina (Solera et al., 1997), ciprofloxacina e rifampicina (Agalar et al., 1999) são pelo menos tão eficientes quanto doxaciclina e rifampicina. Contudo, alguns resultados indicam que a combinação doxaciclina e estreptomicina pode ser mais eficiente do que doxaciclina e rifampicina (Solera et al., 1995), diferença que, aparentemente, pode estar relacionada ao fato de que a rifampicina diminui a concentração sérica da doxaciclina (Colmenero et al., 1994).

Falhas terapêuticas ocorrem com uma frequência que varia de 2 a 22,9% dos casos (Akova et al., 1993; Colmenero et al., 1994; Solera et al., 1995 e 1997). Tratamento com duração mais curta resulta em maior probabilidade de recorrência da

infecção (Solera et al., 1997). Outros fatores que aumentam o risco de recorrência da infecção após o tratamento incluem: hemocultura positiva no início da doença, curso clínico menor ou igual a 10 dias antes do início do tratamento e trombocitopenia. Além disso, indivíduos do sexo masculino têm maior taxa de recorrência (Ariza et al., 1995).

5. *Brucella* sp. COMO AGENTE DE BIOTERRORISMO

Embora seja objeto comum de discussão na imprensa contemporânea, armas biológicas não são novidade. Um bom exemplo disso é que em 1763, Sir Jeffrey Amhurst, comandante das tropas britânicas na América do Norte, deliberadamente causou uma epidemia devastadora de varíola em populações indígenas americanas através da doação de cobertores contaminados provenientes de hospitais (Bellamy & Freedman, 2001; Klietmann & Ruoff, 2001). Em decorrência de episódios recentes de terrorismo nos Estados Unidos, entre eles a circulação de cartas contendo o *Bacillus anthracis* (Chang et al., 2003), bioterrorismo passou a ter alta prioridade para as autoridades governamentais daquele País. Em menor escala, algumas nações europeias também tem desenvolvido maiores esforços para a prevenção e resposta adequada a episódios de bioterrorismo. Considerando-se nossos problemas de natureza sócio-econômica, certamente a prevenção de bioterrorismo não é prioridade no Brasil.

Brucella spp. é listada, pelo US Army Research Institute for Infectious Diseases, entre outros nove agentes com maior potencial para bioterrorismo.

Teoricamente, a liberação de 50Kg de *Brucella* spp. ao longo de dois quilômetros sobre uma população de 500.000 pessoas, poderia resultar em, aproximadamente, 500 mortes e 125.000 incapacitações (Bellamy & Freedman, 2001). O Centers for Disease Control and Prevention dos Estados Unidos considera a *Brucella* spp. como pertencente a categoria B, que corresponde ao grupo em segunda ordem de prioridade como agente de bioterrorismo (www.cdc.gov). Considerando-se que são registrados somente 100 casos de brucelose por ano nos Estados Unidos, tem sido proposto que todo caso de brucelose humana naquele País deve ser considerado sentinela para vigilância contra bioterrorismo (Chang et al., 2003). Recentemente têm surgido inúmeras publicações detalhando os procedimentos e precauções para o trabalho laboratorial em episódios de bioterrorismo, inclusive por *Brucella* spp. Estes trabalhos visam principalmente conscientizar a classe médica, que deve estar apta a reconhecer casos que possam estar associados a um episódio de bioterrorismo. O médico veterinário obviamente tem papel relevante neste contexto uma vez que alguns destes agentes, particularmente a *Brucella* spp., são zoonóticos (Kliemann & Ruoff, 2001; Nulens & Voss, 2002; Robinson-Dunn, 2002; Cherry et al., 2003; Sewell, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGALAR, C; USUBUTUN, S; TURKYILMAZ, R. Ciprofloxacin and rifampicin versus doxycycline and rifampicin in the treatment of brucellosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.18, n.8, p.535-538, 1999.
- ALBALLA, SR. Epidemiology of human brucellosis in southern Saudi Arabia. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.98, p.185-189, 1995.
- ANDRIOPoulos, P; TSIRONI, M; ASIMAKOPOULOS, G. Acute abdomen due to *Brucella melitensis*. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.35, n.3, p.204-205, 2003.
- ANTONIOU, M; ECONOMOU, I; WANG, X; PSAROULAKI, A; SPYRIDAKI, I; PAPADOPOULOS, B; CHRISTIDOU, A; TSAFANTAKIS, E; TSELENTIS, Y. Fourteen-year seroepidemiological study of zoonoses in a greek village. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.66, n.1, p.80-85, 2002.
- AKOVA, M; UZUN, O; AKALIN, HE; HAYRAN, M; ÜNAL, S; GÜR, D. Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.37, n.9, p.1831-1834, 1993.
- AKRITIDIS, N; PAPPAS, G. Ascites caused by brucellosis: a report of two cases. *Scand. J. Gastroenterol.*, v.36, n.1, p.110-112, 2001.
- AL-KHARFY, TM. Neonatal brucellosis and blood transfusion: case report and review of the literature. *Ann. Trop. Paediatr.*, v.21, n.4, p.349-352, 2001.
- ARIZA, J; CORREDOIRA, J; PALLARES, R; VILADRICH, PF; RUFÍ, G; PUJOL, M; GUDIOL, F. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clinical Infectious Diseases*, v.20, n.5, p.1241-1249, 1995.
- ARLETT, PR. A case of laboratory acquired brucellosis. *British Medical Journal*, v.313, p.1130-1132, 1996.
- BANNATYNE, RM; JACKSON, MC; MEMISH, Z. Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.10, p.2673-2674, 1997.
- BARBUDDHE, SB; KUMAR, P; MALIKA, SV; SINGH, DK; GUPTA, LK. Seropositivity for intracellular bacterial infections among abattoir associated personnels. *J. Commun. Dis.*, v.32, n.4, p.295-299, 2000.
- BARUFFA, G. Prevalência sorológica da brucelose na zona sul do Rio Grande do Sul (Brasil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.20, n.2, p.71-75, 1978.
- BAUMGARTEN, D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.63-69, 2002.
- BELLAMY, RJ; FREEDMAN, AR. Bioterrorism. *Q. J. Med.*, v.94, p.227-234, 2001.
- BERGERON, P; GONZALES-FAJARDO, J; MANGIALARDI, N; COURBIER, R. False aneurysm of the abdominal aorta due to *Brucella suis*. *Ann. Vasc. Surg.*, v.6, n.5, p.460-463, 1992.
- BERKELMAN, RL. Human illness associated with use of veterinary vaccines. *Clin. Infect. Dis.*, v.37, n.3, p.407-424, 2003.
- BODUR, H; ERBAY, A; AKINCI, E; COLPAN, A; CEVIK, MA; BALABAN, N. Neurobrucellosis in an endemic area of brucellosis. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.35, n.2, p.94-97, 2003.
- BOSCHIROLI, ML; FOULONGNE, V; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, n.1, p.58-64, 2001.
- BREW, SD; PERRETT, LL; STACK, JA; MACMILLAN, AP; STAUNTON, NJ. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Veterinary Record*, v.24, p.483, 1999.
- CAPASSO, L. Brucellosis at Herculaneum. *International Journal of Osteoarchaeology*, v.9, p.277-288, 1999.
- CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *Journal of Infection*, v.45, n.2, p.122-127, 2002.
- CESUR, S; CIFTCI, A; SOZEN, TH; TEKELI, E. A case of epididymo-orchitis and paravertebral abscess due to brucellosis. *J. Infect.*, v.46, n.4, p.251-253, 2003.
- CHANG, MH; GLYNN, MK; GROSECLOSE, SL. Endemic, notifiable bioterrorism-related diseases, United States, 1992-1999. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.5, p.556-564, 2003.
- CHERRY, CL; KAINER, MA; RUFF, TA. Biological weapons preparedness: the role of physicians. *Internal Medicine Journal*, v.33, p.242-253, 2003.
- DOGANAY, M; AYGEN, B; ESEL, D. Brucellosis due to blood transfusion. *J Hosp Infect*, v.49, n.2, p.151-152, 2001.
- ERBAY, A; BODUR, H; AKINCI, E; COLPAN, A; CEVIK, MA. Spontaneous bacterial peritonitis due to *Brucella melitensis*. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.35, n.3, p.196-197, 2003.
- CLOECKAERT, A; GRAYON, M; GREPINET, O; BOUMEDINE, KS. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes and Infection*, v.5, n.7, p.593-602, 2003.
- CLOECKAERT, A; VERGER, JM; GRAYON, M; PAQUET, JY; GARIN-BASTUJI, B; FOSTER, G; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes and Infection*, v.3, n.9, p.729-738, 2001.
- COKCA, F; AZAP, A; MECO, O. Bilateral mammary abscess due to *Brucella melitensis*. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.31, n.3, p.318-319, 1999.
- COLMENERO, JD; FERNÁNDEZ-GALLARDO, LC; AGÚNDEZ, JAG; SEDEÑO, J; BENÍTEZ, J; VALVERDE, E. Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of brucellosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.38, n.12, p.2798-2802, 1994.
- COLMENERO, JD; QUEIPO-ORTUÑO, MI; REGUERA, JM; SUAREZ-MUÑOZ, MA; MARTÍN-CARBALLINOD, S; MORATA, P. Chronic hepatosplenic abscesses in brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.42, p.159-167, 2002.
- COLMENERO, JD; REGUERA, JM; MARTOS, F; SANCHEZ-DE-MORA, D; DELGADO, M; CAUSSE, M; MARTÍN-FARFAN, A; JUAREZ, C. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)*, v.75, n.4, p.195-211, 1996.
- DEQUIU, S; DONGLOU, X; JIMING, Y. Epidemiology and control of brucellosis in China. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.165-182, 2002.

ERTEM, M; KUREKCI, AE; AYSEV, D; UNAL, E; IKINCIOGULLARI, A. Brucellosis transmitted by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v.26, n.2, p.225-226, 2000.

FENKCI, V; CEVRIOGLU, S; YILMAZER, M. Ovarian abscess due to *Brucella melitensis*. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.35, n.10, p.762-763, 2003.

FERREIRA, CR; FERREIRA, CR; TATAGIBA, TA; SOUTO FILHO, JTD. Espondilodiscite brucelósica: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n.3, p.255-258, 2002.

FIORI, PL; MASTRANDREA, S; RAPPELLI, P; CAPPUCINELLI, P. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.5, p.2005-2006, 2000.

FOSGATE, GT; CARPENTER, TE; CHOMEL, BB; CASE, JT; DEBESS, EE; REILLY, KF. Time-space clustering of human brucellosis, California, 1973-1992. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.7, p.672-678, 2002.

FREITAS, JA; GALINDO, GAR; SANTOS EJC; SARRAF, KA; OLIVEIRA, JP. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. *Revista de Saúde Pública*, v.35, n.1, p.101-102, 2001.

GAMAZO, C; VITAS, AI; LÓPEZ-GOÑI, I; DÍAZ, R; MORIYÓN, I. Factors affecting detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR730, a nonradiometric system for hemocultures. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.12, p.3200-3203, 1993.

GENCER, S; OZER, S. Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Brucella melitensis*. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.35, n.5, p.341-343, 2003.

GEYIK, MF; GÜR, A; NAS, K; ÇEVIK, R; SARAÇ, J; DIKICI, B; AYAZ, C. Musculoskeletal involvement in brucellosis in different age groups: a study of 195 cases. *Swiss Med. Wkly.*, v.132, p.98-105, 2002.

GIL, AD; SAMARTINO, LE. Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Food and Agriculture Organization, 2000.

GIANNACOPOULOS, I; ELIOPOLOU, MI; ZIAMBARAS, T; PAPANASTASIOU, DA. Transplacentally transmitted congenital brucellosis due to *Brucella abortus*. *Journal of Infection*, v.45, n.3, p.209-210, 2002.

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

GÜNGÖR, K; BEKIR, NA; NAMIDURU, M. Ocular complications associated with brucellosis in an endemic area. *Eur. J. Ophthalmol.*, v.12, n.3, p.232-237, 2002.

GÜNGÖR, K; BEKIR, NA; NAMIDURU, M. Recurrent episcleritis associated with brucellosis. *Acta Ophthalmol. Scand.*, v.79, p.76-78, 2001.

GÜR, A; GEYIK, MF; DIKICI, B; NAS, K; ÇEVIK, R; SARAÇ, J; HOSOGLU, S. Complications of brucellosis in different age groups: a study of 283 cases in Southeastern Anatolia of Turkey. *Yousef Medical Journal*, v.44, n.1, p.33-44, 2003.

HARMAN, M; IRMAK, H; ARSLAN, H; ARSLAN, U; KAYAN, M. Popliteal artery pseudoaneurysm: a rare complication of brucellosis. *J. Clin. Ultrasound*, v.32, n.1, p.33-36, 2004.

HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Veterinary Journal*, v.50, N.3, p.179-180, 1997.

IBERO, I; VELA, P; PASCUAL, E. Arthritis of shoulder and spinal cord compression due to *Brucella* disc infection. *British Journal of Rheumatology*, v.36, p.377-381, 1997.

JAHANS, KL; FOSTER, G; BROUGHTON, ES. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Veterinary Microbiology*, v.57, n.4, p.373-382, 1997.

KADIKOYLU, G; TUNCER, G; BOLAMAN, Z; SINA, M. Brucellar orchitis in Innerwest Anatolia Region of Turkey. A report of 12 cases. *Urol. Int.*, v.69, n.1, p.33-35, 2002.

KLIETMANN, WF; RUOFF, KL. Bioterrorism implications for the clinical microbiologist. *Clinical Microbiology Reviews*, v.14, n.2, p.361-381, 2001.

KULA, S; ERER, D; BUYUKATES, M; TUNAOGLU, FS; OLGUNTURK, R; OZDOGAN, EM. Brucella endocarditis: case report and review of the literature. *J. Heart Valve Dis.*, v.10, n.4, p.486-488, 2001.

LACERDA, LM; ALVES, LMC; MATHIAS, LA; RODRIGUES, ALB; ALMEIDA, FM; LACERDA, ML. Brucelose em trabalhadores de matadouros do Município de São Luis, MA, 1997. *Higiene Alimentar*, v.14, p.62-65, 2000.

LANDAU, Z; GREEN, L. Chronic brucellosis in workers in a meat-packing plant. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.31, n.5, p.511-512, 1999.

LARSSON, MHMA. Pesquisa de aglutininas anti *Brucella canis* em soros humanos na cidade de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.14, p.404-407, 1980.

LORIDO, JCA; GOMEZ, JC; REQUENA, JR; DACAL, JCB; TOME, AV; DACAL, PB. Brucellar spondylitis and meningoencephalitis: a case report. *The Netherlands Journal of Medicine*, v.59, p.158-160, 2001.

LUCERO, NE; BOLPE, JE. Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.5, p.1425-1427, 1998.

LUCERO, NE; FOGLIA, L; AYALA, SM; GALL, D; NIELSEN, K. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.10, p.3245-3248, 1999.

LUNA-MARTÍNEZ, JE; MEJÍA-TÉRAN, C. Brucellosis in México: current status and trends. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.19-30, 2002.

MAHAJAN, NK; KULSHRESTHA, RC; VARUDEVAN, B. Brucellosis - cause of abortion in sheep and its public health significance. *International Journal of Zoonoses*, v.13, n.3, p.174-179, 1986.

MALAVOLTA, N; FRIGATO, M; ZANARDI, M; MULÈ, R; LISI, L; GNUDI, S; FINI, M. Brucella spondylitis with paravertebral abscess due to *Brucella melitensis* infection: a case report. *Drugs Exp. Clin. Res.*, v.28, n.2-3, p.95-98, 2002.

MALIK, GM. Early clinical response to different therapeutic regimens for human brucellosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.58, n.2, p.190-191, 1998.

MALONE, FD; ATHANASSIOU, A; NORES, LA; DALTON, ME. Poor perinatal outcome associated with maternal *Brucella abortus* infection. *Obstet. Gynecol.*, v.90, p.674-676, 1997.

MARTÍNEZ-CHAMORRO, E; MUÑOZ, A; ESPARZA, J; MUÑOZ, MJ; GIANGASPRO, E. Focal cerebral involvement by neurobrucellosis: pathological and MRI findings. *European Journal of Radiology*, v.43, p.28-30, 2002.

MARTÍNEZ, CM; JIMÉNEZ, AP; BLANCO, MC; CHAMIZO, ES; MOHEDANO, EM; PLATA, C; BAENA, AV; NAVARRO, FM. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalucia (Spain), January - March 2002. *Eurosurveillance*, v.8, n.7-8, p.164-168, 2003.

MARTIN-MAZUELOS, E; NOGALES, MC; FLOREZ, C; GÓMEZ-MATEOS, JM; LOZANO, F; SANCHEZ, A. Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.8, p.2035-2036, 1994.

MEMISH, ZA; BANNATYNE, RM; ALSHAALAN, M. Endophlebitis of the leg caused by *Brucella* infection. *Journal of Infection*, v.42 n.4, p.281-283, 2001.

MEMISH, ZA; MAH, MW. Brucellosis in laboratory workers at a Saudi Arabian hospital. *American Journal of Infection Control*, v.29, p.48-52, 2001.

MEMISH, ZA; VENKATESH, S. Brucellar epididymo-orchitis in Saudi Arabia: a retrospective study of 26 cases and review of the literature. *BJU International*, v.88, p.72-76, 2001.

METIN, A; AKDENİZ, H; BUZGAN, T; DELICE, I. Cutaneous findings encountered in brucellosis and review of the literature. *International Journal of Dermatology*, v.40, p.434-438, 2001.

Brucelose: zoonose e bioterrorismo

- MIRANDA, RT; GIMENO, AE; RODRIGUEZ, TF; ARRIBA, JJ; OLMO, DG; SOLERA, J. Acute cholecystitis caused by *Brucella melitensis*: case report and review. *Journal of Infection*, v.42, n.1, p.77-88, 2001.
- MONROE, PW; SILBERG, SL; MORGAN, PM; ADESS, M. Seroepidemiological investigation of *Brucella canis* antibodies in different human population groups. *Journal of Clinical Microbiology*, v.2, n.5, p.382-386, 1975.
- MORATA, P; QUEIPO-ORTUÑO, MI; COLMENERO, JD. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.9, p.2443-2446, 1998.
- MORAES, IA; LARANJA, HF; VIEIRA, DK; LOPES, SP; FREAZA, A; MELO, G; PENCHEL, V; MORAES, IA. Identificação de cães potencialmente transmissores de brucelose na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência-Veterinária*, v.9, n.3, p.154-157, 2002.
- MORATA, P; QUEIPO-ORTUÑO, MI; REGUERA, JM; GARCÍA-ORDÓÑEZ, MA; PICARDO, C; COLMENERO, JD. Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.12, p.4163-4166, 1999.
- MORATA, P; QUEIPO-ORTUÑO, MI; REGUERA, JM; MIRALLES, F; LOPEZ-GONZALEZ, JJ; COLMENERO, JD. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.10, p.3743-3746, 2001.
- MORENO, E. Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.31-38, 2002.
- MORENO, E; MORYÓN, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v.99, n.1, p.1-3, 2002.
- MUNFORD, RS; WEAVER, RE; PATTON, C; FEELEY, JC; FELDMAN, RA. Human disease caused by *Brucella canis*. A clinical and epidemiologic study of two cases. *Journal of the American Medical Association*, v.231, n.12, p.1267-1269, 1975.
- NAMIDURU, M; GÜNGÖR, K; DIKENSOY, O; BAYDAR, I; EKİNCİ, E; KARAOGLAN, I; BEKİR, NA. Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. *Int. J. Clin. Pract.*, v.57, n.1, p.20-24, 2003.
- NAVARRO-MARTÍNEZ, A; SOLERA, J; CORREDOIRA, J; BEATO, JL; MARTÍNEZ-ALFARO, E; ATIÉNZAR, M; ARIZA, J. Epididymoorchitis due to *Brucella mellitensis*: a retrospective study of 59 patients. *Clinical Infectious Diseases*, v.33, p.2017-2022, 2001.
- NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.5-9, 2002.
- NULENS, E; VOSS, A. Laboratory diagnosis and biosafety issues of biological warfare agents. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.8, p.455-466, 2002.
- OLIVEIRA, PR; RIBEIRO, SCA; TUNALA, V; OLIVEIRA, PR; RIBEIRO, SCA. Estudo sobre a brucelose em trabalhadores de um abatedouro de equídeos. *Higiene Alimentar*, v.13, p.63-68, 1999.
- ORDUÑA, A; ALMARAZ, A; PRADO, A; GUTIERREZ, MP; GARCIA-PASCUAL, A; DUEÑAS, A; CUERVO, M; ABAD, R; HERNÁNDEZ, B; LORENZO, B; BRATOS, MA; TORRES, AR. Evaluation of an immunocapture agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.11, p.4000-4005, 2000.
- PALANDUZ, A; PALANDUZ, S; GULER, K; GULER, N. Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *International Journal of Infectious Diseases*, v.4, n.1, p.55-56, 2000.
- PAPATSORIS, AG; MPADRA, FA; KARAMOUZIS, MV; FRANGIDES, CY. Endemic brucellar epididymo-orchitis: a 10-year experience. *Int. J. Infect. Dis.*, v.6, n.4, p.309-313, 2002.
- PAPPAS, G; BOSILKOVSKI, M; AKRITIDIS, N; MASTORA, M; KRTEVA, L; TSIANOS, E. Brucellosis and the respiratory system. *Clinical Infectious Diseases*, v.37, p.95-99, 2003.
- PINA, MA; MODREGO, PJ; UROZ, JJ; COBETA, JC; LERIN, FJ; BAIGES, JJ. Brucellar spinal epidural abscess of cervical location: report of four cases. *Eur. Neurol.*, v.45, n.4, p.249-253, 2001.
- POESTER, FP; GONÇALVES, VSP; LAGE, AP. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.55-62, 2002.
- QUEIPO-ORTUÑO, MI; MORATA, P; OCÓN, P; MANCHADO, P; COLMENERO, JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.11, p.2927-2930, 1997.
- REFAI, M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.81-110, 2002.
- REGUERA, JM; ALARCON, A; MIRALLES, F; PACHON, J; JUAREZ, C; COLMENERO, JD. *Brucella* endocarditis: clinical, diagnostic, and therapeutic approach. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.22, n.11, p.647-650, 2003.
- RENUKARADHYA, GJ; ISLOOR, S; RAJASEKHAR, M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.183-195, 2002.
- RICHMOND, JY; MCKINNEY, RW. (eds). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 3ed. Washington: Centers for Disease Control and Prevention e National Institutes of Health, 1993.
- ROBINSON-DUNN, B. The microbiology laboratory's role in response to bioterrorism. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.126, p.291-294, 2002.
- ROBSON, JM; HARRISON, MW; WOOD, RN; TILSE, MH; MCKAY, AB; BRODRIBB, TR. Brucellosis: re-emergence and changing epidemiology in Queensland. *Med. J. Aust.*, v.159, n.3, p.153-158, 1993.
- ROMERO, C; GAMAZO, C; PARDO, M; LÓPEZ-GOÑI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.3, p.615-617, 1995.
- RUBEN, B; BAND, JD; WONG, P; COLVILLE, J. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet*, v.337, p.14-15, 1991.
- RUIZ, J; LORENTE, I; PÉREZ, J; SIMARRO, E; MARTÍNEZ-CAMPOS, L. Diagnosis of brucellosis by using blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.9, p.2417-2418, 1997.
- SAMARTINO, LE. Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.71-80, 2002.
- SAMDANI, PG; PATIL, S. Neurobrucellosis. *Indian Pediatrics*, v.40, p.565-568, 2003.
- SEIDEL, G; PARDO, CA; NEWMAN-TOKER, D; OLIVI, A; EBERHART, CG. Neurobrucellosis presenting as leukoencephalopathy. The role of cytotoxic T lymphocytes. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.127, p.374-377, 2003.
- SEoud, MA; KANJI, SS; HABLI, M; ARAJ, GF; KHALIL, AM. *Brucella* pelvic tubo-ovarian abscess mimicking a pelvic malignancy. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.35, n.4, p.277-278, 2003.
- SEWELL, DL. Laboratory safety practices associated with potential agents of biocrime or bioterrorism. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.7, p.2801-2809, 2003.
- SHAALAN, MA; MEMISH, ZA; MAHMOUD, SA; ALOMARI, A; KHAN, MY; ALMUNEUF, M; ALALOLA, S. Brucellosis in children: clinical observations in 115 cases. *Int. J. Infect. Dis.*, v.6, n.3, p.182-186, 2002.
- SISTERON, O; SOUCI, J; CHEVALLIER, P; CUA, E; BRUNETON, JN. Hepatic abscess caused by *Brucella* US, CT and MRI findings. Case report and review of the literature. *Journal of Clinical Imaging*, v.26, p.414-417, 2002.
- SMITS, HL; BASAHI, MA; DÍAZ, R; MARRODAN, T; DOUGLAS, JT; ROCHA, A; VEERMAN, J; ZHELUDKOV, MM; WITTE, OWM; JONG, JD; GUSSENHOVEN, GC; GORIS, MGA; VAN DER HOORN, MAWG. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.12, p.4179-4182, 1999.

SOHN, AH; PROBERT, WS; GLASER, CA; GUPTA, N; BOLLEN, AW; WONG, JD; GRACE, EM; MCDONALD, WC. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.4, p.485-488, 2003.

SOLERA, J; ESPINOSA, A; MARTÍNEZ-ALFARO, E; SÁNCHEZ, L; GEIJO, P; NAVARRO, E; ESCRIBANO, J; FERNÁNDEZ, JA. Treatment of human brucellosis with doxycycline and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, n.1, p.80-84, 1997.

SOLERA, J; LOZANO, E; MARTÍNEZ-ALFARO, E; ESPINOSA, A; CASTILLEJOS, MA; ABAD, L. Brucellar spondylitis: review of 35 cases and literature survey. *Clinical Infectious Diseases*, v.29, p.1440-1449, 1999.

SOLERA, J; RODRÍGUEZ-ZAPATA, M; GEIJO, P; LARGO, J; PAULINO, J; SÁEZ, L; MARTÍNEZ-ALFARO, E; SÁNCHEZ, L; SEPULVEDA, MA; RUIZ-RIBÓ, MD; GECMEI GROUP. Doxycycline-rifampin versus doxycycline-streptomycin in treatment of human brucellosis due to *Brucella melitensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39, n.9, p.2061-2067, 1995.

SPINOLA, AG; COSTA, MDM. Brucelose humana em operários de um frigorífico no município de Salvador, Bahia, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.6, p.157-165, 1972.

TSIRKA, A; MARKESINIS, I; GETSI, V; CHALOULOU, S. Severe thrombocytopenic purpura due to brucellosis. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.34, n.7, p.535-536, 2002.

VARGAS O, FJ. Brucellosis in Venezuela. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.39-44, 2002.

VERMIGLIO, F; STASSI, G; FINOCCHIARO, MD; TRIMARCHI, F. Thyroiditis due to *Brucella melitensis*. *J. Endocrinol. Invest.*, v.18, n.4, p.308-310, 1995.

WÉIL, Y; MATTAN, Y; LIEBERGALL, M; RAHAV, G. *Brucella* prosthetic joint infection: a report of 3 cases and a review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v.36, p.81-86, 2003.

WHITE JR., AC; ATMAR, RL. Infections in Hispanic Immigrants. *Clinical Infectious Diseases*, v.34, p.1627-1632, 2002.

YAGUPSKY, P. Detection of *Brucellae* in Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.11, p.3437-3442, 1999.

YAGUPSKY, P. Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR660 Blood Culture System. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.8, p.1899-1901, 1994.

YAGUPSKY, P; PELED, N; PRESS, J; ABRAMSON, O; ABU-RASHID, M. Comparison of BACTEC 9240 Peds Plus Medium and Isolator 1.5 Microbial Tube for detection of *Brucella melitensis* from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.6, p.1382-1384, 1997.

YAGUPSKY, P; PELED, N; PRESS, J. Use of BACTEC 9240 Blood Culture System for detection of *Brucella melitensis* in synovial fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.2, p.738-739, 2001.

YORGANCIGIL, H; YAYLI, G; OYAR, O. Neglected case of osteoarticular *Brucella* infection of the knee. *Croatian Medical Journal*, v.44, n.6, p.761-763, 2003.

YOUNG, EJ; TARRY, A; GENTA, RM; AYDEN, N; GOTUZZO, E. Thrombocytopenic purpura associated with brucellosis: report of 2 cases and literature review. *Clinical Infectious Diseases*, v.31, p.904-909, 2000.

ZERVA, L; BOURANTAS, K; MITKA, S; KANSOUZIDOU, A; LEGAKIS, NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.4, p.1661-1664, 2001.

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E TUBERCULOSE (PNCEBT)

Andrey Pereira Lage¹

Fernando Padilla Poester²

Vítor Salvador Picão Gonçalves³

Eliana Roxo⁴

Ernst Eckehardt Müller⁵

João Crisostomo Mauad Cavalléro⁶

José Soares Ferreira Neto⁷

Pedro Moacyr Pinto Coelho Motta⁸

Vera Cecília Ferreira de Figueiredo⁹

José Ricardo Lôbo¹⁰

1. HISTÓRICO DO CONTROLE DA BRUCELOSE BOVINA NO BRASIL

As primeiras tentativas de controle da brucelose no Brasil datam das décadas de 1940-1950. As medidas propostas se restringiam ao exame sorológico de vacas que abortaram, com segregação dos reagentes e vacinação com B19 (Menezes, 1950; D'Apice, 1954).

Com o pequeno avanço no controle da doença nos anos seguintes, novas diretrizes nacionais foram propostas para fortalecer as medidas de controle, principalmente a vacinação de todas as bezerras com B19 e montagem de comitês de brucelose, com a participação de representantes governamentais das áreas de saúde pública e animal e produtores de leite e de carne (Vinhas, 1958).

A partir de 1944, diversos decretos foram sancionados pelo Ministério da Agricultura instituindo medidas para o controle de brucelose. Entre eles destacam-se a identificação de todos os animais vacinados com B19, as diretrizes para a importação e exportação de animais e a exigência de testes antes do trânsito de animais ou da sua participação em feiras.

Em 1976, a Portaria 23/76 do Ministro da Agricultura (Brasil, 1977) propôs um programa nacional de controle da brucelose baseado na vacinação voluntária de bezerras, diagnóstico de rebanhos com animais infectados e teste e sacrifício voluntário dos animais reagentes. Este programa nunca foi completamente implantado e a situação epidemiológica continuou estável, com altas prevalências da doença nas regiões mais importantes na produção de bovinos.

Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose (PNCEBT)

Além das iniciativas do governo federal, os órgãos de defesa sanitária de alguns Estados empreenderam individualmente ações para o controle da brucelose. Em 1965, o Estado do Rio Grande do Sul iniciou um programa de vacinação progressivo contra brucelose, que atingiu 80% de cobertura vacinal em bezerras e resultou em uma significativa redução na prevalência da doença no Estado (Rio Grande do Sul, 1974). Da mesma forma, em 1994 o Estado de Minas Gerais implementou um programa de vacinação que atingiu, em 2003, uma cobertura vacinal de cerca de 75% de bezerras em idade de vacinação o que, segundo dados oficiais recentes, resultou na diminuição da prevalência da brucelose naquele Estado¹¹.

Em 2000, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) revisou as estratégias e a legislação sobre o controle da brucelose bovina no país e, no início de 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi instituído (Brasil, 2001a e b). As estratégias contidas no Regulamento Técnico do PNCEBT (Brasil, 2004a) incluem:

- ✓ a vacinação obrigatória de bezerras com idade entre 3 e 8 meses com vacina B19;
- ✓ certificação voluntária de propriedades livres;
- ✓ monitoramento voluntário de propriedades de gado de corte baseado em amostragens periódicas;
- ✓ exigência de atestados negativos para trânsito interestadual de animais para

¹¹ LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F. Comunicação pessoal.

- reprodução e para ingresso em exposições, feiras e leilões;
- ✓ sacrifício dos animais reagentes;
- ✓ padronização dos métodos de diagnóstico e
- ✓ capacitação e habilitação de médicos veterinários do setor privado aos quais o serviço de defesa sanitária delegará competências.

No contexto desta publicação somente serão abordados os aspectos relativos à brucelose contidos no Regulamento Técnico do PNCEBT (Brasil, 2004a).

O PNCEBT foi instituído pelo MAPA em função da necessidade de se institucionalizar e implementar um programa que visasse melhorar a efetividade das medidas de combate à brucelose e à tuberculose, com embasamento numa estratégia populacional e não apenas em medidas isoladas aplicadas a rebanhos infectados.

O PNCEBT tem por objetivos baixar a prevalência e a incidência da brucelose e da tuberculose e certificar um número elevado de propriedades, nas quais o controle e erradicação destas enfermidades sejam executados com rigor e eficácia, objetivando aumentar a oferta de produtos de baixo risco para a saúde pública. Esta garantia sanitária na origem, associada à modernização das cadeias produtivas do leite e da carne, visa aumentar a produtividade e a competitividade dos produtos pecuários, nos mercados interno e externo, oferecendo ao consumidor um produto de maior valor agregado.

Pelas semelhanças na epidemiologia, diagnóstico e formas de controle da brucelose nos bovinos e bubalinos,

medidas sanitárias do PNCEBT são aplicadas a estas duas espécies animais. O controle da brucelose em outras espécies é regulamentado por normas específicas.

As estratégias adotadas pelo PNCEBT consistem em um conjunto de medidas sanitárias compulsórias, associadas, entretanto, a ações de adesão voluntária. Por suas características, este Programa introduz uma nova abordagem nas relações entre os agentes envolvidos na saúde animal. Para a efetivação do PNCEBT e para que o mesmo obtenha resultados consistentes e efetivos, será necessária uma estreita colaboração entre todos os níveis dos setores privado e público do agronegócio da carne e do leite.

2. EVOLUÇÃO DA SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

O último diagnóstico completo de situação da brucelose bovina em nível nacional foi realizado em 1975, tendo estimado a porcentagem de animais soropositivos em 4,0% na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na Região Nordeste e 4,1% na Região Norte (Brasil, 1977). Posteriormente, outros levantamentos sorológicos por amostragem, realizados em alguns estados, revelaram pequenas alterações na prevalência de brucelose (Brasil, 2001a): no Rio Grande do Sul a prevalência passou de 2,0%, em 1975, para 0,3% em 1986; em Santa Catarina passou de 0,2%, em 1975, para 0,6% em 1996; no Mato Grosso do Sul a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3%, idêntica ao valor encontrado em 1975 para o território Mato-grossense (Estado do Mato Grosso do Sul e parte do Mato Grosso); em Minas Gerais passou de 7,6%, em 1975, para

6,7% em 1980 (Castro, 1982); no Paraná, a prevalência estimada em 1975 foi de 9,6%, passando para 4,6% de bovinos soropositivos em 1989. Os dados de notificações oficiais indicavam que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5%, no período de 1988 a 1998 (Brasil, 2001a).

Em 2002, o Departamento de Defesa Animal / MAPA, iniciou um projeto ambicioso de realização de estudos de prevalência e fatores de risco da brucelose bovina em todo o país. Os trabalhos vêm sendo efetuados em colaboração com os serviços de defesa sanitária animal de cada unidade federativa, e o Ministério conta com o apoio da Universidade de São Paulo e da Universidade de Brasília. Resultados parciais¹² confirmaram que a prevalência é muito baixa em Santa Catarina, onde a frequência de focos (i.e. de propriedades com animais infectados) foi de 0,02%. No Paraná, a prevalência de focos foi baixa (0,34%) na região Sul, junto a SC, mas alta na região Oeste (14,72%), na divisa com Mato Grosso do Sul e São Paulo. Em São Paulo encontrou-se prevalência de focos distribuída de forma homogênea em todo o Estado, com valor médio de 9,7%.

Em Minas Gerais, o valor de aproximadamente 1% de prevalência de animais infectados confirma o impacto do programa de vacinação obrigatória iniciado no Estado em 1994 e serve de bom exemplo para a implementação do PNCEBT.

A Região Centro-Oeste apresentou as prevalências mais altas, chegando no Mato

¹² LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F. Comunicação pessoal. 2004.

Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose (PNCEBT)

Grosso a 41,19% de focos e 10,45% de animais. Esta é uma informação de grande importância epidemiológica porque confirma que a brucelose não está apenas confinada, ou mesmo concentrada, nas bacias leiteiras do país.

A grande disseminação em áreas de criação extensiva de gado de corte, que abrigam grande parte do rebanho bovino nacional, justifica e reforça a priorização do programa de vacinação contra a enfermidade, uma vez que esta é a medida mais barata e eficaz de baixar a prevalência da brucelose neste tipo de sistema produtivo. O trabalho segue agora em estados das regiões Norte e Nordeste.

3. ESTRUTURA LEGAL

O PNCEBT foi instituído pela Instrução Normativa Ministerial Nº2/01 de 10 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001c), que também atribuiu ao Secretário de Defesa Agropecuária a incumbência de baixar o Regulamento Técnico do PNCEBT.

A Instrução Normativa do SDA Nº2/01 de 10 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001b) aprova o Regulamento Técnico do PNCEBT. Em 08 de janeiro de 2004, o Regulamento Técnico do PNCEBT foi republicado (Instrução Normativa do SDA Nº06/04) com pequenas alterações, como correções de termos, melhor definição de alguns parágrafos e a possibilidade de supressão da vacinação obrigatória quando a situação epidemiológica justificar (Brasil, 2004a).

A Instrução Normativa do SDA Nº10 de 15 de janeiro de 2004 (Brasil, 2004b) estabelece as normas para habilitação de médicos veterinários do setor privado para atuação junto ao PNCEBT. Além dessas

normas já existentes, outras normas complementares foram e serão publicadas ao longo das diferentes fases do PNCEBT.

A coordenação do PNCEBT está a cargo do Departamento de Defesa Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA, com assessoria de um Comitê Científico Consultivo em Brucelose (*B. abortus*) e Tuberculose Animal (*M. bovis*) (Brasil, 2003), e as ações de implementação e fiscalização do PNCEBT são executadas pelas Delegacias Federais de Agricultura nos Estados e, principalmente, pelos órgãos de defesa sanitária animal estaduais (Brasil, 2004a).

4. PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE

4.1. Testes e estratégias de diagnóstico aprovados pelo PNCEBT

O Regulamento Técnico do PNCEBT (Brasil, 2004a) aprovou para o diagnóstico de brucelose os testes do antígeno acidificado tamponado (AAT) e o teste do anel em leite (TAL), como testes de rotina, e o teste do 2-mercaptoetanol (2ME) e a fixação de complemento (FC), como testes confirmatórios.

O teste do anel em leite (TAL) pode ser empregado na triagem ou monitoramento de rebanhos leiteiros e pode ser realizado por veterinários habilitados, por laboratórios credenciados ou oficiais e pelo serviço de defesa sanitária animal. A interpretação dos resultados será qualitativa e os rebanhos com amostras reagentes devem ter seus animais testados individualmente.

O teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) é empregado na triagem de animais e pode ser realizado por veterinários habilitados e por laboratórios credenciados ou oficiais. A interpretação dos resultados é qualitativa. Em rebanhos comprovadamente infectados o médico veterinário poderá optar por condenar o animal apenas com o resultado do AAT, privilegiando assim a sensibilidade do diagnóstico e acelerando o processo de saneamento do rebanho. Nas situações em que é necessário evitar resultados falsos positivos, quando se pretende boa especificidade, pode-se, então, aplicar o método de testes em série, em que os animais reagentes ao AAT são submetidos a teste confirmatório.

O teste do 2-mercaptoetanol (2ME) é empregado para a confirmação dos animais reagentes ao teste do AAT e só pode ser realizado por laboratórios credenciados ou oficiais. A interpretação dos resultados é quantitativa e os critérios de interpretação levam em consideração o histórico de vacinação dos animais (Brasil, 2004a).

Os resultados de soros testados pelo 2ME podem ser negativos, inconclusivos ou positivos. Os animais com soros que reagiram positivamente são considerados infectados e devem ser sacrificados. Os animais com resultados inconclusivos ao 2ME podem ser submetidos ao teste de fixação do complemento ou ser testados novamente num prazo de 30 a 60 dias com o 2ME. A interpretação do teste é a mesma no novo teste. Entretanto, nos caso de novo resultado não conclusivo seja obtido, o animal deve ser destinado ao sacrifício, pois na impossibilidade de se determinar o status sanitário do animal, o programa não pode correr o risco da manutenção de

animais infectados, e consequentemente, da infecção no rebanho.

A fixação de complemento (FC) também poderá ser utilizada como teste confirmatório em animais reagentes ao AAT e só será realizada por laboratórios oficiais. A interpretação dos resultados do teste é quantitativa. É o teste de referência para o trânsito internacional de animais, de acordo com normas da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (MacMillan & Stack, 2000).

Para a realização dos testes de triagem no diagnóstico de brucelose e responsabilidade técnica no processo de saneamento e monitoramento das propriedades, o serviço oficial de defesa sanitária animal habilita médicos veterinários que atuam no setor privado (Brasil, 2004a; Brasil, 2004b).

Para sua habilitação junto ao PNCEBT, o médico veterinário privado deve ter sido aprovado em curso de treinamento e capacitação reconhecido pelo MAPA, estar em dia com o Conselho Regional de Medicina Veterinária e requerer sua habilitação na Unidade Local do Serviço de Defesa Sanitária Animal do Estado, em conjunto com os órgãos estaduais de defesa sanitária animal da respectiva unidade da federação onde irá atuar. A aprovação em curso de treinamento e capacitação reconhecido pelo MAPA tem validade em todo o território nacional, mas o médico veterinário deverá requerer sua habilitação em cada estado em que for trabalhar.

O médico veterinário habilitado deve cumprir o Regulamento Técnico e demais normas complementares do PNCEBT e

possuir infra-estrutura e material adequados à execução dos testes de triagem para brucelose. Além disto, deve fornecer informações e apresentar relatórios de atividades relacionadas com o PNCEBT na Unidade Veterinária Local do serviço oficial de defesa sanitária animal.

5. VACINAÇÃO

5.1. Vacinação obrigatória contra Brucelose com B19

Dentre as ações obrigatórias do PNCEBT está a vacinação de bezerras com idade entre 3 e 8 meses contra brucelose com a vacina B19. A eficácia desta vacina no controle da doença e na diminuição dos prejuízos causados pela brucelose bovina e bubalina já foi demonstrada em muitos países (Nicoletti, 1990). O objetivo desta vacinação é conseguir baixar, num prazo razoável, a prevalência da brucelose nos rebanhos afetados, fato este fundamental para o avanço em direção à erradicação da doença (ORGANIZACIÓN..., 1986).

Essa vacinação obrigatória em todo o território nacional iniciou-se com a publicação do PNCEBT e, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2003, os serviços estaduais de defesa sanitária iniciaram sua implantação gradativa dentro dos estados. No início de 2004, a vacinação obrigatória já havia sido implantada, com coberturas vacinais distintas na maioria dos estados, salvo em parte das Regiões Nordeste e Norte, onde alguns estados estão ainda em fase de estruturação dos serviços de defesa sanitária animal.

Uma exceção à implantação da vacinação obrigatória de bezerras jovens com B19 é

observada no Estado de Santa Catarina. Em função da baixa prevalência de brucelose existente naquele estado (Sikusawa *et al.*, 2004), o serviço estadual de defesa sanitária animal, em consonância com o MAPA, optou pela não implantação da vacinação obrigatória e está em estudo pelo MAPA a definição de normas para áreas avançadas de erradicação de brucelose, nas quais o Estado de Santa Catarina poderia se enquadrar.

O responsável pela emissão de receituário para aquisição da vacina, pela vacinação dos animais, pela emissão de atestados de vacinação e dos relatórios dos animais vacinados é o médico veterinário cadastrado no serviço estadual de defesa sanitária animal. Em regiões onde os veterinários privados não atendam plenamente a demanda do programa de vacinação, o próprio serviço oficial deverá assumir essa responsabilidade. No entanto, é importante evitar que essa exceção se transforme em regra, o que poderia levar de novo a um modelo não sustentável de implementação unicamente baseado na ação estatal. O envolvimento dos médicos veterinários no processo é necessário para diminuir os riscos da utilização de uma vacina viva, potencialmente patogênica para o homem.

Além da emissão do atestado de vacinação, as bezerras vacinadas devem ser marcadas a ferro candente com a letra "V", acompanhada do algarismo final do ano de vacinação, no lado esquerdo da cara. As fêmeas destinadas ao registro genealógico, quando devidamente identificadas, ou aquelas identificadas individualmente por sistema aprovado pelo MAPA, ficam excluídas da obrigatoriedade da marcação a fogo.

A fiscalização da vacinação é feita por via de mecanismos semelhantes aos do Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA), já em vigor há muitos anos. Consiste em comprovação da vacinação a cada seis meses, a partir da qual se estabelece a base de fiscalização, por exemplo, quando o produtor necessita emitir uma Guia de Trânsito Animal, para qualquer finalidade.

5.2. Vacinação contra Brucelose com vacina não indutora de anticorpos (RB51)

Recentemente foi aprovada pelo MAPA a utilização no país da vacina com a amostra rugosa de *Brucella abortus* RB51 (Licença 8724/2003), em animais com idade superior a 8 meses. Por sua característica rugosa, esta amostra não interfere no diagnóstico sorológico da brucelose (Schurig *et al.*, 2002; Poester *et al.*, 2004).

O objetivo da utilização desta vacina é aumentar a cobertura vacinal em animais acima de 8 meses de idade, com consequente aumento da imunidade de rebanho e sem interferência no diagnóstico, o que deverá levar a uma diminuição mais rápida das taxas de prevalência e incidência da brucelose.

A RB51 foi aprovada pelo MAPA para utilização em fêmeas adultas que nunca foram vacinadas, não reagentes aos testes de diagnóstico, em focos de brucelose e em situações de alto risco de infecção, onde se justificam vacinações estratégicas.

Por ser uma vacina viva, muitas das recomendações de utilização da B19, como não ser utilizada em machos e em fêmeas

prenhas, devem ser adotadas para a RB51. Precauções na vacinação e no descarte dos materiais utilizados, também se aplicam à RB51.

Todas as normas relativas à aquisição, vacinação e emissão de atestados previstas para a B19 também devem ser observadas com relação à RB51.

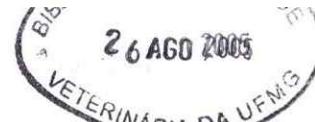
6. CERTIFICAÇÃO DE PROPRIEDADES LIVRES E DE PROPRIEDADES MONITORADAS

As certificações de propriedades livres e monitoradas para brucelose são de adesão voluntária e visam, respectivamente, obter grande número de propriedades com risco mínimo de presença dessas doenças e obter grande número de propriedades com risco baixo e monitorado.

O PNCEBT preconiza medidas que são comuns à certificação de propriedades livres e à certificação de propriedades monitoradas, bem como medidas específicas para cada tipo de certificação.

Para iniciar o processo, que deverá ser custeado pelo proprietário, este necessita ter um médico veterinário habilitado responsável pelo rebanho e solicitar formalmente a certificação da propriedade junto à Unidade Veterinária Local do serviço de defesa sanitária animal onde está cadastrada a propriedade.

As atividades de saneamento são realizadas pelo médico veterinário habilitado e todas as atividades de fiscalização e certificação são realizadas pelo serviço oficial de defesa sanitária animal no Estado, de acordo com as normas do MAPA.



A propriedade necessita possuir identificação individual de animais, com sistema indicado pelo MAPA ou aprovado pelo serviço oficial de defesa sanitária animal.

Todas as fêmeas com idade entre 3 e 8 meses têm, obrigatoriamente, que ser vacinadas com B19 e identificadas segundo as normas do PNCEBT.

Os animais elegíveis a serem submetidos aos testes diagnósticos para brucelose são aqueles com idade superior a 8 meses, caso não sejam vacinados, e com idade igual ou superior a 24 meses, caso tenham sido vacinados entre 3 e 8 meses com B19.

Os animais reagentes positivos aos testes confirmatórios para brucelose ou, a critério do médico veterinário habilitado responsável pelo rebanho, os animais reagentes ao AAT, deverão ser marcados com ferro candente com um "P" contido em um círculo de oito centímetros de diâmetro no lado direito da cara. Estes animais deverão ser separados dos outros animais do rebanho e afastados imediatamente da produção leiteira. Num prazo máximo de 30 dias após o diagnóstico, estes animais deverão ser sacrificados em frigoríficos sob serviço de inspeção oficial. Os animais reagentes positivos deverão chegar ao estabelecimento de abate acompanhado de Guia de Trânsito Animal (GTA), informando a condição de positivo, e o serviço de inspeção oficial do estabelecimento deverá ser notificado da chegada dos animais com antecedência mínima de 12 horas. Na impossibilidade de sacrifício em frigoríficos sob inspeção oficial, os animais reagentes positivos aos testes para brucelose devem ser destruídos

na propriedade, sob supervisão de veterinário oficial.

Outro requisito para a obtenção e manutenção do certificado de propriedade livre ou monitorada para brucelose é a aquisição exclusiva de animais negativos para brucelose. Os animais oriundos de outras propriedades certificadas como livres terão introdução livre. Outros animais deverão ser submetidos a dois testes de diagnóstico para brucelose, sendo o primeiro durante os 30 dias antes do embarque do animal e o segundo até 30 dias após a chegada dos animais à propriedade, com um intervalo mínimo de 30 dias entre os testes. Os animais adquiridos deverão permanecer isolados desde o ingresso na propriedade de destino, até o segundo resultado negativo. Somente para as propriedades certificadas livres de brucelose, ou em certificação, caso não seja possível manter os animais isolados na propriedade de destino, os dois testes poderão ser efetuados na propriedade de origem durante os 60 dias que antecedem o embarque, num intervalo de 30 a 60 dias entre testes.

6.1. Certificação de Propriedades Livres

As medidas específicas preconizadas pelo PNCEBT para a certificação de propriedades livres de brucelose visam garantir que nenhum animal infectado permaneça na propriedade. Para tanto, requer que todos os animais elegíveis para o diagnóstico sejam testados e que a propriedade apresente três testes de rebanho consecutivos negativos para a certificação e que a manutenção da certificação se fará mediante novo teste

anual com resultado negativo de todo o rebanho.

Durante o saneamento do rebanho, os testes diagnósticos para brucelose devem ser realizados num intervalo de 30 a 90 dias. A certificação de propriedade livre de brucelose será obtida após a obtenção de três testes de rebanho negativos consecutivos, ou seja, após todos os animais do rebanho apresentarem resultados negativos em três testes consecutivos. O intervalo entre o primeiro teste negativo e o segundo, deve ser de 90 a 120 dias e o intervalo entre o segundo teste negativo e o terceiro, deve ser de 180 a 240 dias. O terceiro teste de rebanho negativo deverá ter a coleta de material acompanhada por veterinário oficial e ser realizado em laboratório oficial. Após cumpridas as exigências previstas no PNCEBT, a propriedade receberá o certificado de livre de brucelose, o qual deverá ser renovado anualmente.

Nos casos de serem detectados um ou mais animais reagentes positivos no novo teste (*reteste*) anual, haverá a suspensão temporária do certificado de propriedade livre. Para o retorno à condição de livre, é necessário obter dois testes de rebanho negativos, realizados com intervalo de 30 a 90 dias, sendo o primeiro efetuado 30 a 90 dias após o sacrifício ou destruição do último animal reagente positivo.

Para verificar e validar a condição sanitária da propriedade certificada, ou em certificação, o médico veterinário oficial poderá, em qualquer momento e sem ônus para o proprietário, coletar material para diagnóstico de brucelose.

6.2. Certificação de Propriedades Monitoradas

A certificação de propriedades monitoradas para brucelose e tuberculose é exclusiva para propriedades produtoras de bovinos e bubalinos de corte. A estratégia para o monitoramento é baseada em testes diagnóstico por amostragem aleatória de animais do plantel de reprodutores e na inspeção sanitária de todos os animais da propriedade abatidos. As medidas propostas visam incluir no PNCEBT grande parte do rebanho bovino brasileiro, com destaque para a Região Centro-Oeste, onde predominam grandes fazendas de gado de corte, em criação extensiva e em rebanhos com milhares de animais. A estratégia seguida consiste em manter o rebanho de animais utilizados para reprodução sob vigilância sistemática e atuar sempre que a infecção seja detectada. Não se trata de declarar rebanhos livres, mas sim de garantir risco epidemiológico muito baixo.

A amostragem será realizada no plantel de reprodutores, machos e fêmeas, com idade superior a 24 meses. No primeiro ano será utilizada uma amostra que possibilite 99% de probabilidade de detecção de pelo menos um animal infectado no rebanho, se a prevalência for igual ou superior a 1%. Nas amostragens anuais subsequentes, será empregada uma amostra que possibilite 95% de probabilidade de detecção de pelo menos um animal infectado no rebanho, se a prevalência for igual ou superior a 1%.

Caso algum animal seja considerado positivo para brucelose, todos os animais do plantel de reprodutores, machos e fêmeas acima de 24 meses, que não haviam sido incluídos na amostra, devem

ser testados. Todos os animais considerados positivos para brucelose deverão ser sacrificados em frigorífico sob inspeção oficial dentro de 30 dias do diagnóstico, segundo as recomendações do PNCEBT. O certificado de propriedade monitorada será emitido após o primeiro teste por amostragem negativo ou, caso se detectem animais positivos nesse teste, após o teste de todo o plantel de reprodutores e sacrifício dos animais positivos. A renovação da certificação é anual e será feita por repetição dos testes por amostragem.

7. CONTROLE DE TRÂNSITO

Com o objetivo de diminuir a disseminação da brucelose, o Regulamento Técnico do PNCEBT (Brasil, 2004a) prevê o controle de trânsito interestadual de animais reprodutores, machos e fêmeas, e de animais que se destinam a exposições ou leilões de gado de elite. A presença de infecção nestes animais constitui grande risco de introdução de brucelose em outros rebanhos ou regiões. Somente animais oriundos de propriedades certificadas livres de brucelose, de propriedades monitoradas ou animais portadores de atestados negativos válidos, poderão ter Guia de Trânsito Animal (GTA) emitidas para transitar entre os estados ou para participar de exposições ou leilões de elite.

Os atestados deverão ser emitidos por médico veterinário habilitado pelo PNCEBT e terão validade de 60 dias a partir da data da coleta de sangue para diagnóstico.

Os testes diagnósticos para trânsito de animais devem ser realizados em todas as fêmeas não vacinadas e machos com idade

superior a 8 meses e em fêmeas vacinadas com B19, entre 3 e 8 meses de idade, com idade igual ou superior a 24 meses. Excluem-se dos testes animais cujo destino final seja o abate (animais de corte), animais castrados, animais oriundos de propriedades certificadas livres de brucelose ou de propriedades monitoradas e fêmeas vacinadas com B19, entre 3 e 8 meses de idade, com idade inferior a 24 meses. As fêmeas vacinadas com B19 com idade inferior a 24 meses devem apresentar atestado de vacinação emitido por médico veterinário cadastrado para a emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA).

8. COMENTÁRIOS FINAIS SOBRE O PNCEBT

O PNCEBT vem preencher uma lacuna nas políticas de sanidade animal do Brasil. Foi elaborado com visão de longo prazo e, portanto, estabelece estratégias que só deverão começar a ter impacto real em alguns anos. Entende-se que essa é a única forma de encarar o controle de uma doença de caráter crônico como a brucelose. A combinação de medidas obrigatórias, das quais se espera impacto populacional em grande escala, com medidas mais seletivas, que visam aumentar de forma paulatina o número de unidades de criação de baixo risco, poderá resultar em boa adesão ao Programa e evitar a tentação de resolver todos os problemas de uma só vez.

Espera-se que o envolvimento dos prestadores de serviços veterinários privados e das Escolas de Medicina Veterinária no processo tenha bons resultados e crie uma dinâmica menos dependente das estruturas estatais, o que é característico em outros programas de sanidade animal.

O PNCBET também nasce como um programa dinâmico, adaptando-se a novas situações e ao aparecimento de novos insumos e técnicas que possam contribuir para o avanço do combate à brucelose. O programa prevê a possibilidade de introdução de novos testes diagnósticos ou novas vacinas, desde que sejam de interesse do PNCEBT e sejam aprovados pelo MAPA. Um exemplo disto foi a aprovação em 2003 da utilização da vacina RB51 no país.

A evolução e consolidação do PNCEBT vai depender da capacidade de adequar as políticas propostas às necessidades de longo prazo de toda a cadeia produtiva. O envolvimento de todos os agentes comprometidos, produtores e consumidores, será fundamental para que o controle da brucelose avance e se transforme em demanda da sociedade, e não apenas em aplicação de um conjunto de normas e procedimentos técnicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura. *Diagnóstico de Saúde Animal*. Brasília, 1977.
- BRASIL. Departamento de Defesa Animal. Informações sobre o PNCBET. Brasília, Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Jan 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>. Acesso em : 2001a.
- BRASIL, Secretaria de Defesa Agropecuária Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 2., 10 jan 2001. Diário Oficial, 4 jun 2001. Seção 1, 26-31, 2001b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 2 de 10 de janeiro de 2001. Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, ?? jan. 2001, Seção 1, 2001c.

BRASIL. Departamento de Defesa Agropecuária, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria DDA N° 73 de 04 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 08 dez. 2003, Seção 2, p. 4. 2003.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 6 de 8 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 jan. 2004, Seção 1, p. 6-10. 2004a.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 10 de 15 de janeiro de 2004. Estabelece as normas de habilitação de médicos veterinários do setor privado para atuação junto ao Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal-PNCEBT. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 jan. 2004, Seção 1, p. 2-4. 2004b.

Castro, D. Prevalência da brucelose nas áreas trabalhadas pelo IESA em Minas Gerais-1980. Boletim IESA. v. 1, p. 1-12, 1982.

D'APICE, M. Combate a brucelose bovina no estado de São Paulo baseado na aplicação da "Brucella 19". In: Anais do II Congresso Panamericano de Medicina Veterinária, p.113-136, 1954.

MacMILLAN, A.P. & STACK, J. Bovine Brucellosis. In: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 4 ed. Paris: Office International des Epizooties, p. 328-345, 2000.

Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose (PNCEBT)

MENEZES, H.T. Contribuição para o estudo da brucelose bovina no Triângulo Mineiro. In: *V Congresso Brasileiro de Veterinária*, p 649-657, 1950.

NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p.283-299, 1990.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *Comité mixto FAO/OMS de expertos en Brucellosis*. Sexto informe. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 149p. 1986. (Serie de Informes Técnicos 740).

POESTER, F.P., SAMARTINO, L.E., LAGE, A.P. Diagnóstico da brucelose bovina. *Cad. Téc.*, v. XX, p.xx-xx, 2004

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura. Estimativa da prevalência da brucelose, 1974.

SIKUSAWA, Suzana; AMAKU, Marcos; FERREIRA NETO, José Soares; DIAS, Ricardo Augusto; LOBO, José Ricardo; FIGUEIREDO, Vera Cecilia; GONÇALVES, Vitor Salvador Picão; FERREIRA, Fernando. Prevalência e Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no estado de Santa Catarina. Resultados parciais. In: XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2004, São Luís MA. XXXI Conbravet. 2004.

SCHURIG, G.G., SRIRANGANATHAN, N, CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v.90, p. 479-496, 2002.

VINHAS, C. Sugestões para um programa de erradicação de Brucelose. *Rev. Bras. Malariaol.*, v.10, p.101-110, 1958.