

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA  
AGROPECUÁRIA**

**INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DE *Brucella* spp.  
EM SUÍNOS NO ESTADO DA BAHIA**

**Manoela Barbosa Batista**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2016**

# **INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DE *Brucella* spp. EM SUÍNOS NO ESTADO DA BAHIA**

**Manoela Barbosa Batista**

Médica Veterinária

Universidade Federal da Bahia, 1999

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do curso de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Defesa Agropecuária.

**Orientador:** Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

**Co-orientador:** MSc. Jorge Raimundo Lins Ribas

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

B333i

Batista, Manoela Barbosa.

Investigação soroepidemiológica de *Brucella* spp. em suínos no Estado da Bahia / Manoela Barbosa Batista.\_ Cruz das Almas, BA, 2016.

83f.; il.

Orientador: Dr. Robson Bahia Cerqueira.

Coorientador: MSc. Jorge Raimundo Lins Ribas.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Brucelose em suínos. 2.Sorodiagnóstico. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.08969

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA  
AGROPECUÁRIA**

**INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DE *Brucella* spp. EM  
SUÍNOS NO ESTADO DA BAHIA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Manoela Barbosa Batista

Aprovada em: 09 de junho de 2016

Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira  
UFRB - Orientador

Prof. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante  
UFRB - Examinadora Interna

Prof. Dra. Priscila Furtado Campos  
UFRB - Examinadora Interna

Prof. Dra. Isabella de Matos Mendes da Silva  
UFRB - Examinadora Externa ao Programa

## AGRADECIMENTOS

Nunca deixo de agradecer a Deus por todas as oportunidades que coloca em minha vida.

Aos meus pais, Eliana Barbosa Batista e Itamar Tavares Batista, meus amores, grandes incentivadores e apoiadores nas minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira por aceitar esse desafio.

À Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), minha segunda casa, que permitiu minhas ausências na execução deste estudo.

Ao meu chefe imediato Aurino Soares de Mello Jr., por ser tão compreensivo.

Às minhas queridas e amadas amigas Lucyla Maia de A. Mariz Flor e Sylvia Soraya de Souza Freitas pelo imenso carinho.

À querida amiga Isabel Maier, que percorreu esses mesmos caminhos junto comigo, obrigada por tudo.

À querida amiga Adriana Battista Matos, pela disponibilidade e grande ajuda.

À Adailton Sacramento Costa por emoções... se chorei ou se sorri...

À Evandro Moraes Silva, amigo que incentivou e deu total apoio ao tema escolhido.

Ao pessoal do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) por toda a ajuda durante a realização das provas sorológicas.

À Thaise Marques Alves, que faz parte do LDI e que durante todo esse período praticamente me adotou, com toda paciência, ensinando e ajudando com os testes.

Ao Laboratório de Defesa Sanitária Animal (LADESA) da ADAB, na pessoa do grande amigo Jorge Raimundo Lins Ribas, por todo apoio e amizade sempre.

À Marcio Santos Batista, querido, que realizou parte da pesquisa no LADESA.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

## INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DE *Brucella* spp. EM SUÍNOS NO ESTADO DA BAHIA

**RESUMO:** A criação de suínos para subsistência é muito comum na Bahia e algumas vezes se apresenta de forma precária, com animais soltos, expostos ao risco de contaminação por agentes patogênicos, podendo muitas vezes levar a prejuízos econômicos ou de saúde pública. Entre estes agentes, um dos mais preocupantes é a brucelose, uma enfermidade infectocontagiosa que causa comprometimento reprodutivo em várias espécies de mamíferos, com evolução geralmente crônica, considerada uma das mais importantes e difundidas zoonoses no mundo. A sorologia aplicada para diagnóstico da brucelose em suínos no Brasil detecta positividade para amostras lisas de *Brucella* spp., no entanto não se pode afirmar se estes animais se encontram infectados por *B. abortus* ou *B. suis*, havendo a preocupação de que esta última esteja emergindo como um agente de infecção em bovinos. Ainda há pouca informação sobre a real distribuição desta enfermidade entre os suínos, principalmente em relação às criações em conjunto com outros animais de forma extensiva. Em face da necessidade de demonstrar a situação epidemiológica entre as espécies que possam atuar como reservatórios da bactéria procedeu-se o presente estudo com o objetivo de realizar um inquérito soropidemiológico no estado da Bahia sobre a brucelose suína. Para o experimento, utilizou-se 889 amostras de soro suíno provenientes de 320 propriedades, distribuídas por 96 municípios baianos, armazenadas no Laboratório de Sanidade Animal da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal (LADESA-ADAB). As amostras foram submetidas aos testes AAT e ELISA indireto (iELISA) no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (LDI-UFRB). Ao teste do AAT, 42 amostras (4,72%) apresentaram reação de aglutinação, num total de 32 propriedades (10%). Estes soros foram encaminhados ao LADESA-ADAB para confirmação por meio da prova do 2-ME/SAL, com apenas 01 (um) resultado positivo. Todos os soros foram testados no iELISA, com antígeno de *B. abortus*, detectando 10 animais positivos (1,12%) em 9 propriedades (2,81%). Mesmo com baixa ocorrência, fica evidenciada a presença de *Brucella* spp. na espécie suína no estado da Bahia, podendo comprometer avanços do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), além de eminente risco para a saúde pública.

**Palavras chave:** *B. suis*; brucelose suína; iELISA; zoonose

## SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF *Brucella* spp. IN SWINE IN THE STATE OF BAHIA

**ABSTRACT:** The pig breeding for subsistence is very common in Bahia and sometimes presents itself precariously, with animals loose, exposed to the risk of contamination by pathogens and can often lead to economic losses or public health harm. Among these agents, one of the most worrying is brucellosis, an infectious disease that causes reproductive impairment in several species of mammals, usually with chronic course, considered one of the most important and widespread zoonosis in the world. The serology applied for the diagnosis of swine brucellosis in Brazil detects positive results to smooth samples of *Brucella* spp., nonetheless it cannot be stated whether these animals are infected with *B. abortus* or *B. suis*, there is concern that the latter is emerging as an agent of infection in cattle. There is still little information on the actual distribution of this disease among swine, especially in relation to breeding together with other animals in an extensive manner. Given the need to demonstrate the epidemiological situation among the species that can act as reservoirs of bacteria, this study was carried out with the aim of conducting a seroepidemiological survey in the state of Bahia on swine brucellosis. For the experiment, it was used 889 samples of swine sera from 320 properties spread over 96 municipalities in Bahia, stored in the Animal Health Laboratory of the State Animal Health Agency (LADESA-ADAB). The samples were submitted to the BPAT and indirect ELISA (iELISA) tests in Infectious Diseases Laboratory of the Federal University of Bahia Recôncavo (LDI-UFRB). To BPAT, 42 (4.72%) samples showed agglutination reaction, a total of 32 properties (10%). These sera were sent to LADESA-ADAB to confirmation by proof of 2-ME/TAT, with only 01 (one) positive result. All sera were tested in iELISA with antigen from *B. abortus*, detecting 10 positive animals (1.12%) in 9 (2.81%) properties. Even with low occurrence, it is evidenced the presence of *Brucella* spp. in swine in the state of Bahia, which may compromise progress of the National Programme for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT), and imminent risk to public health.

**Key words:** *B. suis*; swine brucellosis; iELISA; zoonosis

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Modo de transmissão da brucelose suína ( <i>B. suis</i> ).....	29
Figura 2 - Distribuição geográfica da amostragem e resultados positivos ao AAT e iELISA, no Estado da Bahia.....	72



## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela I – Resultados obtidos para <i>Brucella</i> spp. nos testes AAT, 2-ME/SAL e iELISA, em suínos no Estado da Bahia.....	71
Tabela II – Municípios e propriedades que apresentaram pelo menos um suíno reagente para <i>Brucella</i> spp. aos testes do AAT, 2-ME/SAL e iELISA, no Estado da Bahia.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
2-ME	2 mercaptoetanol
$\alpha$	Alfa
AAT	Antígeno acidificado tamponado
ADAB	Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia
$\beta$	Beta
bv	Biovar
CFU	Unidade de formação de colônia
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico ou dióxido de carbono
CUT-OFF	Ponto de corte
D.O.	Densidade Ótica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EPI	Equipamento de proteção individual
FC	Teste de Fixação de Complemento
g	Gramma
GRSC	Granjas reprodutoras de suínos certificadas
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água oxigenada
H <sub>2</sub> S	Ácido sulfídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
IDGA	Imunodifusão em Gel de Ágar
IFN- $\lambda$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina dois
IL-4	Interleucina quatro
IN	Instrução Normativa
LPS	Lipopolisacarídeo
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro

M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
mP	Mili polarização
Nm	Nanômetro
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PBS	Solução tampão fosfato bibásico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PNSS	Programa Nacional de Sanidade Suídea
PSC	Peste suína clássica
RBT	Teste Rosa Bengala
ROC	Característica de operação do receptor
S-LPS	Lipopolisacarídeo de proteína suave
SAL	Soroaglutinação lenta em tubos
SAR	Soroaglutinação rápida
TECPAR	Instituto Tecnológico do Paraná
TPF	Teste de Polarização de Fluorescência
UE	União Européia
UI/ml	Unidades internacionais por mililitro
v/v	Concentração volume/volume (para líquidos)

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2 OBJETIVOS</b>	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
3.1 AGENTE ETIOLÓGICO	16
3.2 CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS E TINTORIAIS	17
3.3 EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	19
3.4 PATOGÊNESE E SINAIS CLÍNICOS	22
3.5 RESPOSTA IMUNE	26
3.6 TRANSMISSIBILIDADE	27
3.7 IMPACTO ECONÔMICO E NA SAÚDE PÚBLICA	29
3.8 DIAGNÓSTICO	33
3.8.1 Diagnóstico clínico	35
3.8.2 Diagnóstico epidemiológico	35
3.8.3 Diagnóstico laboratorial	36
3.8.3.1 Sorológico	36
3.8.3.1.1 Antígeno acidificado tamponado e 2-mercaptoetanol	37
3.8.3.1.2 Imunodifusão em gel de ágar	40
3.8.3.1.3 Teste de polarização de fluorescência	41
3.8.3.1.4 Ensaio Imunoenzimático	42
3.8.3.1.5 Fixação de complemento	44
3.8.3.2 Biologia molecular	45
3.8.3.3 Isolamento e identificação	49
3.9 CONTROLE E PREVENÇÃO	51
ARTIGO	53
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	73
REFERÊNCIAS	74

## 1 INTRODUÇÃO

A Brucelose é uma das zoonoses mais importantes e difundidas no mundo, causada por bactérias do gênero *Brucella*, com largo espectro infeccioso. Atinge várias espécies silvestres e domésticas, acarretando sérios prejuízos à pecuária e grave perigo à saúde pública. Cada espécie de *Brucella* tem hospedeiro predileto, mas não restrito (LOPES, NICOLINO, HADDAD, 2010).

No Brasil, a grande preocupação tanto de saúde animal quanto do conseqüente risco para a saúde pública, é a brucelose bovina causada pela *B. abortus*, devido ao numeroso rebanho bovino e ampla distribuição no território brasileiro. A brucelose suína, com a tecnificação na exploração comercial dessa espécie, teve uma redução acentuada de prevalência, embora focos esporádicos ainda possam ocorrer (MATHIAS, 2008).

Comumente provocada pela *Brucella suis*, não é descartada a infecção pela *B. abortus*, quando suínos são criados de forma promíscua com bovinos, o que ocorre normalmente em criações para subsistência. Nessas condições, um animal doente representa prejuízo econômico pela queda na produtividade, risco para a saúde dos demais animais, além de preocupação com contaminação humana (AGUIAR et al., 2006).

Os suínos estão suscetíveis à brucelose a partir do quarto ao quinto mês de idade. A enfermidade é transmitida de um suíno a outro através da ingestão de alimentos ou água contaminados por descargas vulvares ou pela ingestão de fetos abortados e membranas fetais. É uma doença de evolução crônica na qual as porcas infectadas apresentam abortamento em qualquer fase da gestação, influenciado mais pelo tempo de exposição ao agente do que ao período de gestação. Nos machos predomina a orquite, podendo afetar secundariamente outros órgãos genitais e é comum o isolamento no sêmen, sem que o animal apresente sinal clínico, sendo considerada para a espécie a transmissão através da cópula. Em ambos os sexos

pode afetar as articulações causando artrites e paralisia (MARTINS, 1993; JESUS et al., 2010).

Seguindo diretrizes preconizadas por organismos internacionais, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaborou e lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (BRASIL, 2006). O programa demanda ações coordenadas do serviço oficial e privado, que objetivam não só a eliminação da enfermidade, mas também a organização e o fortalecimento do serviço de defesa sanitária animal (FERREIRA NETO, 2009), porém não legisla sobre a enfermidade na espécie suína.

De acordo com a OIE (2009), os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), o teste de Rosa Bengala (RBT) e a Fixação de Complemento (FC) são os testes prescritos para fins de comércio internacional, sendo o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) muito útil na identificação de suínos infectados. Todos eles com o mesmo protocolo preconizado para a brucelose bovina.

Nacionalmente, a sorologia aplicada para diagnóstico da brucelose suína detecta positividade para amostras lisas de *Brucella*, não podendo afirmar se estes animais se encontram infectados por *B. abortus* ou *B. suis*. É observada, principalmente em propriedades pequenas, a criação concomitante de várias espécies, das quais comumente estão presentes os bovinos e suínos, representando um risco ao sucesso do PNCEBT, uma vez que pode haver contaminação cruzada. Além da escassez de dados que remetem à prevalência dessa enfermidade no Brasil (ROSA, GARCIA, MEGID, 2012).

A brucelose suína ainda é uma doença subdiagnosticada com importância para as cadeias produtivas da pecuária e para a saúde pública. Tendo em vista que grande parte dos criatórios de suínos na Bahia apresenta características de subsistência, criados em estruturas simples e muitas vezes soltos em ambiente comum com outras espécies, o estudo soroepidemiológico no estado, poderá demonstrar a capacidade do suíno como possível reservatório de *Brucella* spp., contribuindo para melhor eficiência do PNCEBT e sua interdisciplinaridade na saúde pública.

Sendo assim, o banco de soros do inquérito da Peste Suína Clássica foi aproveitado

por possuir amostragem distribuída pelo estado da Bahia, no intuito de demonstrar que o suíno pode estar infectado por *Brucella* spp., podendo funcionar como hospedeiro da *B. abortus*, comprometendo as ações do PNCEBT, principalmente em uma futura fase de erradicação da brucelose neste estado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo soroepidemiológico da brucelose em amostras de suínos criados para subsistência demonstrando seu papel na disseminação desta enfermidade e na saúde pública no estado da Bahia.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar os dados das fichas de visita obtidas do inquérito epidemiológico para Peste Suína Clássica nas informações pertinentes para brucelose em criações de suínos no estado da Bahia.
- Utilizar as provas sorológicas AAT, 2-ME/SAL e iELISA padronizadas para amostras de bovinos, para investigar amostras suínas.
- Demonstrar a importância do suíno como possível reservatório da Brucelose na disseminação desta enfermidade entre outras espécies, principalmente nos rebanhos bovinos e bubalinos.
- Determinar a distribuição de suínos soropositivos no estado da Bahia.
- Identificar riscos da criação para subsistência e sua implicação na saúde pública.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A brucelose é uma doença zoonótica causada por bactéria do gênero *Brucella*, pertencente à família Brucellaceae da classe Alphaproteobacteria (CARRINGTON et al., 2012). Filogeneticamente é classificada dentro da subdivisão  $\alpha 2$  de proteobactérias, que inclui *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhodobacter* e *Rhizobium* (KO, SPLITTER, 2003). Esta classificação é baseada principalmente nas diferenças de características bioquímicas e fenotípicas, de patogenicidade, de hospedeiro preferencial e de ambiente (XAVIER et al., 2009; CARRINGTON et al., 2012).

Atualmente são reconhecidas 10 espécies que não são específicas quanto ao hospedeiro que infectam, embora possuam predileção por determinada espécie animal. As espécies clássicas são *B. abortus* (bovinos e bubalinos), *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. suis* (suínos), *B. canis* (caninos), *B. ovis* (ovinos) e *B. neotomae* (rato do deserto). Posteriormente foram descritas as espécies marinhas *B. ceti* (cetáceos) e *B. pinnipedialis* (pinípedes). Mais recentemente a *B. microti* (roedores e raposas) e *B. inopinata* (isolada de prótese mamária humana) (BARGEN, GORVEL, SALCEDO, 2012). Uma nova estirpe ainda sem nome, *Brucella* spp. NVSL 07-0026, foi recentemente isolada em um babuíno, demonstrando que há mais informações a serem exploradas quanto ao gênero *Brucella* spp. e a sua gama de hospedeiros (KALTUNGO et al., 2014).

A brucelose suína foi diagnosticada pela primeira vez por Hutyra, em 1904, sendo caracterizada como uma doença infecciosa associada a abortos, infertilidade e aumento da taxa de mortalidade de leitões desmamados. Por alguns anos, esta infecção foi atribuída à *B. abortus*, mas em 1929 Huddleston a classificou como *Brucella suis* (MOTTA et al., 2010; EFSA, 2009). O primeiro caso de brucelose no Brasil foi relatado na espécie humana em 1913 (POESTER, GONÇALVES, LAGE,

2002). Desde então, têm sido realizados vários estudos sobre a presença da infecção em bovinos, bubalinos, suínos, caprinos e ovinos.

EFSA (2009) afirma que *B. suis* consiste de cinco biovars (1; 2; 3; 4 e 5), no entanto, a infecção em suínos é causada principalmente pelos três primeiros, que normalmente ocorrem na natureza sob a forma lisa. A infecção causada pelos biovars 1 e 3 é semelhante, mas difere da ocasionada pelo bv 2 na especificidade de hospedeiros, patogenicidade e distribuição geográfica. Pouco encontrado em suínos, de acordo com Xavier et al. (2009), o bv 4 infecta principalmente renas e alces, além de bisontes, raposas árticas e lobos. O bv 5 apresenta-se em roedores silvestres.

No contexto da saúde pública, o bv 2 é raramente patogênico para os seres humanos, enquanto que os bv 1 e 3 são altamente patogênicos, podendo causar doença grave. Esses biovars já foram relatados na Europa, China, nas Américas Central, do Norte e do Sul, Sul da Ásia e ilhas do Pacífico (Austrália) (XAVIER et al., 2009; DI FEBO et al., 2012). Em suínos, na América Latina e, conseqüentemente no Brasil, segundo Acha, Szyfres (2001), só foi isolado o bv 1.

*B. suis* pode infectar bovinos, equinos e caninos, porém o bv 2 é muito raramente notificado em bovinos e pequenos ruminantes, ao contrário na lebre europeia (*Lepus europaeus*), que é considerada seu reservatório. Áreas onde a brucelose é enzoótica em ruminantes, suínos podem ser contaminados pela *B. melitensis* ou *B. abortus* (EFSA, 2009), porém esta última é menos patogênica (JESUS et al., 2010), embora seja mais identificada quando há criação de forma promíscua com bovinos (ROXO, BERSANO, PORTUGAL, 1996).

### 3.2 CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS E TINTORIAIS DO AGENTE

*Brucella* spp. são cocobacilos ou bacilos curtos Gram negativos, imóveis, não

capsulados, não formadores de esporos, intracelulares facultativos, geralmente dispostos isoladamente, mas podem se apresentar em pares ou menos frequentemente em pequenos grupos. O comprimento varia de 0,6 a 1,5  $\mu\text{m}$  e o diâmetro de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$ . A morfologia é constante e formas pleomórficas são raras, exceto em culturas antigas (GARCIA, 2008; EFSA, 2009; XAVIER et al., 2009).

De acordo com Godfroid et al. (2013), por ser uma bactéria Gram negativa, pode resistir a tratamento ácido fraco, aparecendo em vermelho após coloração Stamp. Outros patógenos são corados da mesma forma e têm uma morfologia semelhante, tais como *Chlamydophila abortus* (anteriormente denominada *Chlamydia psittaci*) e *Coxiella burnetii*, mostrando que esta característica não é suficientemente específica.

Tem como principal componente de sua parede celular o lipopolissacarídeo (LPS), cuja estrutura determina a morfologia das colônias em lisas ou rugosas. Colônias lisas possuem um LPS completo, o qual é composto por um lipídio A, seguido de um oligossacarídeo e uma cadeia O-polissacarídeo. As rugosas diferenciam-se por não possuir esta última cadeia. *B. canis* e *B. ovis* são espécies naturalmente rugosas e as demais são consideradas lisas (VICENTE, 2013).

A membrana externa da *B. suis* é composta principalmente por fosfolipídios e lipopolissacarídeos de proteínas suaves (S-LPS), que é o antígeno imunodominante e induz anticorpos no hospedeiro. O S-LPS é formado por uma porção interior de glicolipídio, contendo o oligossacarídeo do núcleo mais o lipídio A, e de um polissacarídeo de cadeia exterior. Essa cadeia é a porção O antígeno relevante na *B. suis* e é quimicamente composta por um homopolímero perosamina mostrando principalmente ligações  $\alpha$ -1,2. De acordo com suas características morfológicas, *Brucella suis* é indistinguível das outras espécies de *Brucella* lisas, o que a leva a reagir em testes de aglutinação com antissoros produzidos contra culturas lisas (EFSA, 2009).

### 3.3 EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A brucelose suína causada por *B. suis* biovar 1; 2 e 3 é difundida na maioria dos continentes (GODFROID, 2002; JESUS et al., 2010). Na América do Sul e no Sudeste da Ásia as notificações são mais elevadas (OIE, 2009). Na Europa e América do Norte, ocorre em menor prevalência, predominando em suínos selvagens (VICENTE, 2013).

Não há relatos de ocorrência na Suécia, Israel, Noruega e Reino Unido. Já na Alemanha, França, Dinamarca, Áustria, Portugal e Espanha, casos esporádicos foram descritos. A doença clínica foi comunicada recentemente na Argentina, Burundi, Equador, França, Macedônia e Sérvia e Montenegro (OIE, 2016).

Godfroid (2002) relata que ao longo de décadas buscou-se a erradicação dessa enfermidade na população de suínos domésticos nos EUA e na Austrália, tornando-se limitada principalmente aos suínos selvagens (*B. suis* bv 1 e 3). Na Europa o bv 2 é o mais comumente isolado, sendo restrito a este continente (ACHA, SZYFRES, 2001).

A brucelose não tem sido relatada em suínos domésticos na Bélgica desde 1969, mas em 1994, *B. suis* bv 2 foi isolada de javali (*Sus scrofa*) morto por caçador, demonstrando a circulação da bactéria entre essa população. Desde então, este biovar foi isolado a partir de javalis em muitos países da Europa Central e Ocidental, como França, Suíça, Alemanha, Espanha e Croácia (GRÉGOIRE et al., 2012).

Em alguns países da Europa tem-se investigado a elevada taxa de infecção de javalis por *B. suis* bv 2, funcionando como reservatório e podendo representar um risco para a propagação da infecção em animais domésticos, principalmente suínos e bovinos e, em menor grau, uma fonte de infecção para o homem (GODFROID et al., 2005).

É considerada endêmica em suínos selvagens na região central de Queensland, Austrália, com registros também em suínos domésticos e gado, além do isolamento de *B. suis* ter sido relatado em suínos e seres humanos em 21 províncias da China.

Países africanos do sub-Saara notificaram oficialmente brucelose suína entre 1996 e 2000. Mali, Nigéria e República Democrática do Congo (então Zaire) relataram previamente a doença (EFSA, 2009).

No Egito a brucelose suína está presente e o agente mais comumente isolado é a *B. melitensis* bv 3, porém muitas vezes a infecção não era reconhecida e nem declarada, de acordo com Refai (2002). Em levantamento realizado no Japão, Watarai et al. (2006) apresentaram resultado positivo de 7,8% das amostras de soro de javalis (*Sus scrofa leucomystax*) para anticorpos para *B. suis* usando o teste de Aglutinação em Tubo e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Nenhum caso foi relatado em suínos domésticos.

Segundo Acha, Szyfres (2001), a enfermidade é enzoótica na maior parte da América Latina, onde se suspeita haver a maior prevalência de *B. suis* no mundo, entretanto, apenas a infecção devido ao bv 1 foi confirmada. Na América Central o agente etiológico tem sido isolado de suínos e humanos. O bv 1 foi identificado em vários países da América do Sul, a exemplo do México e também como uma causa de abortos em suínos no centro da Venezuela. Na Argentina é estudada desde os anos de 1940, com percentuais altos até a década de 1980 (14,2 a 25%), diminuindo com o avanço da tecnificação das explorações comerciais (SAMARTINO, 2002).

No Brasil, *B. suis* é considerada a segunda infecção mais prevalente do gênero *Brucella* spp. (JESUS et al., 2010), mesmo que alguns levantamentos específicos em suínos tenham sido realizados ao longo dos anos, demonstrando que após 1981 a prevalência de anticorpos diminuiu, provavelmente devido à intensificação e integração de produção de suínos em grandes agrupamentos industriais (POESTER, GONÇALVES, LAGE, 2002).

Relatos da ocorrência de suínos soropositivos para brucelose no Brasil são escassos. Roxo, Bersano, Portugal (1996) ao avaliarem 42 amostras de soro suíno, no estado de São Paulo, encontraram 37 (88,09%) amostras positivas na prova sorológica do AAT e observaram que alguns animais apresentavam sintomatologia clínica, além de demonstrar também a contaminação de cães, equino e um homem. Granjas que possuem menor tecnologia e pouco investimento em biossegurança

são mais vulneráveis à entrada de patógenos.

Freitas et al. (2001) submeteram às provas de “card test” e SAR 139 amostras suínas com procedência de abatedouros clandestinos, encontrando 42,2% de positividade, demonstrando um elevado risco sanitário para as pessoas envolvidas nesse tipo de abate e população em geral.

Foram realizadas as provas sorológicas de soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e de 2-mercaptoetanol (2-ME) em 972 suínos de cinco granjas comerciais da Zona da Mata de Pernambuco, encontrando 309 (31,8%) animais positivos na SAL e oito (0,8%) positivos no 2-ME. Fatores como idade, manejo higiênico sanitário e inseminação artificial podem ter influenciado nos resultados positivos (RIBEIRO et al., 2001).

Matos et al. (2004) examinaram 829 amostras de suínos de 40 granjas pertencentes a 22 municípios do estado de Goiás, em que 37 granjas mantinham os animais em confinamento e em três os reprodutores e leitões eram mantidos ao ar livre, apenas um animal foi reagente ao “card test”.

Propriedades rurais do município de Monte Negro (RO) que desenvolviam atividades de agricultura familiar, foram avaliadas por Aguiar et al. (2006), que testaram um total de 104 suínos por meio do AAT com um animal positivo, mas que reagiu negativamente nas provas SAL e 2-ME.

Já Silva et al. (2009) não encontraram resultados positivos para brucelose em 342 suínos no estado de Alagoas, salientando-se que a pesquisa foi realizada em granjas de animais em confinamento total e com prática de inseminação artificial.

No estado do Rio de Janeiro, Jesus et al. (2010) encontraram 12,8% de fêmeas suínas reagentes no AAT. No mesmo ano, em estudo contemplando 13 estados brasileiros, Motta et al. (2010) analisaram soros procedentes de explorações caracterizadas como granjas de suínos, de javalis e criatórios de suínos. Os animais reagentes ao AAT variaram entre 0,2% em javalis e 100% em granjas suínas, porém os respectivos soros foram negativos nas provas de SAL e 2-ME.

Em outra pesquisa no estado de São Paulo, Borges et al. (2011) realizaram as

provas de AAT, SAL, 2-ME e Fixação de Complemento (FC) em soros procedentes de dez granjas de reprodutores de suínos certificadas (GRSC) registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no período de 2001 a 2003. Do total de amostras (2.085), nove foram reagentes no AAT e negativas para exames confirmatórios, como o 2-ME e Fixação do Complemento.

Rosa, Garcia, Megid (2012) analisaram no estado de São Paulo, 910 soros de suínos de 30 diferentes propriedades, encontrando 25 (3%) reagentes ao AAT, dos quais 21 também foram positivos na prova de SAL e 2 no teste do 2-ME. Durante surto de *B. suis* em Jaboticabal (SP), Meirelles-Bartoli, Mathias, Samartino (2012) estudaram amostras de soros de 271 matrizes e 62 animais em terminação utilizando as provas de AAT, 2-ME e FC, encontrando reagentes em todas elas, além de reações em algumas pessoas testadas. *B. suis* bv 1 foi cultivada, evidenciando a presença desse agente no Brasil.

Em um matadouro público de Patos (PB) foram testados, por meio do AAT, 306 amostras de soros de suínos abatidos, dos quais três animais foram positivos e na prova confirmatória do 2-ME apenas 2 reagiram positivamente (AZEVEDO et al., 2012).

Braga (2013) pesquisou a prevalência de anticorpos anti-*Brucella* spp. em suínos no estado do Piauí, obtendo 0,52% de resultado positivo por método confirmatório do 2-ME em 384 animais pesquisados, provenientes de rebanhos de criação intensiva em que, mesmo com a baixa prevalência, foi sugerida a necessidade de realizar medidas de controle da doença e combate aos abates clandestinos para impedir a disseminação desta zoonose.

### 3.4 PATOGÊNESE E SINAIS CLÍNICOS

Mecanismos de virulência complexos e não totalmente compreendidos permitem

que a *B. suis* seja capaz de sobreviver e multiplicar-se no interior das células fagocíticas, assim como invadir uma ampla variedade de tipos celulares com o progresso da infecção, levando a crer que a evolução da enfermidade dependa da capacidade bactericida destas células (BARGEN, GORVEL, SALCEDO, 2012).

*Brucella* spp. ingressa no organismo do hospedeiro pelas mucosas do trato respiratório, digestivo, genital, ocular ou por soluções de continuidade na pele. As bactérias são então fagocitadas, principalmente por macrófagos (XAVIER et al., 2010). Grande parte é eliminada pela fusão fagolisossomal, porém quando são envoltas por compartimentos acidificados, os fagossomas podem desencadear a expressão de várias proteínas necessárias para a sobrevivência de *B. suis* nos macrófagos (ARENAS et al., 2000).

Após a fagocitose, as bactérias são carregadas até os linfonodos regionais, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas ou meses. Sua multiplicação pode ocorrer em células fagocíticas ou não, porém, possuem maior tropismo por macrófagos, células dendríticas e trofoblastos (GODFROID et al., 2011).

Segundo Ko, Splitter (2003), os macrófagos são o substrato para a replicação de *Brucella*, bem como o veículo para espalhá-la aos diferentes tecidos e órgãos. Sua disseminação sistêmica é auxiliada pelas células dendríticas, excelentes carreadoras por possuírem propriedades migratórias (BARGEN, GORVEL, SALCEDO, 2012). Com o progresso da infecção nos animais prenhes, trofoblastos eritrofagocitários agem como células hospedeiras replicadoras e são o principal local a partir do qual as bactérias se espalham para as membranas fetais e feto (EFSA, 2009).

Outros elementos também são citados como necessários para o metabolismo de *Brucella* spp. Destacam-se produtos da degradação dos hormônios esteróides, a Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), o Estradiol - 17β (E17β) entre outras progestinas (GARCIA, 2008). Meador, Deyoe (1989) pesquisaram a presença de *B. abortus* no útero grávido de vacas, onde possivelmente os produtos da degradação desses hormônios sejam utilizados no metabolismo dessas bactérias, que colonizam e se multiplicam principalmente dentro dos trofoblastos.



Passada a multiplicação inicial, as bactérias liberadas pela ação de hemolisinas, atingem a corrente sanguínea permanecendo livres no plasma ou dentro dos macrófagos, atingindo os tecidos do hospedeiro e colonizando principalmente órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como baço, fígado e linfonodos, além dos rins, articulações e órgãos reprodutivos. Há uma predileção por locais com maior disponibilidade de eritritol, elemento necessário ao seu metabolismo, presente principalmente no útero gravídico, tecidos mamários e osteoarticulares e órgãos do sistema reprodutor masculino. Os gânglios mandibulares, gastro-hepáticos, ilíacos internos e retro-faringeanos são os principais alvos de *B. suis* (BARTHASSON, 2005; GARCIA, 2008).

A bacteremia ocorre de uma a sete semanas após a infecção e persiste de forma intermitente por aproximadamente cinco semanas. Em suínos tem-se observado que pode ocorrer de uma semana a trinta e quatro meses após a infecção e geralmente esse período cursa sem sinais clínicos (VICENTE, 2013). Durante os períodos de bacteremia, *B. suis* pode ser isolada de vários órgãos, entretanto, se a fêmea estiver gestante, a placenta é o local de eleição (BARTHASSON, 2005).

A sobrevivência e multiplicação nos macrófagos são fatores de virulência considerados responsáveis pelo estabelecimento, desenvolvimento e cronicidade da infecção (KO, SPLITTER, 2003; BARGEN, GORVEL, SALCEDO, 2012). O caráter crônico advém da capacidade da *B. suis* para sobreviver ao oxigênio intermediário reativo e ao óxido nítrico, ativando genes bacterianos em resposta ao ambiente ácido do fagossomo, impedindo a fusão fagolisossomal pela remodelação do compartimento (XAVIER et al., 2010). *B. suis* é capaz de colonizar o retículo endoplasmático, onde se multiplica ativamente, podendo prevenir a apoptose (EFSA, 2009).

Os sinais clínicos da infecção por *B. suis* variam de acordo com a idade do animal, o tempo de exposição e o órgão acometido, podendo ser transitivos e raramente evoluem para morte. A maioria dos animais não evidencia sinais da infecção e alguns manifestam quadro febril persistente ou transitório (MEGID, MATHIAS, ROBLES, 2010).

Leitões e animais jovens apresentam espondilite associada à rarefação óssea especialmente das regiões lombar e sacral, artrite, claudicação e ocasionalmente evoluem para paralisia dos membros posteriores, apesar de que esses sinais podem ser detectados em ambos os sexos e qualquer faixa etária. Classicamente observa-se abortos, orquite e laminite (XAVIER et al., 2009).

As porcas infectadas apresentam abortamento em qualquer fase da gestação, influenciado principalmente pelo tempo de exposição ao agente. Nesta fase os trofoblastos se tornam as células alvo, porém a capacidade da bactéria em se multiplicar rapidamente e em grandes quantidades dentro dessas células pode comprometer a integridade da placenta resultando na infecção do feto e consequente aborto, podendo ocorrer também distúrbios como natimortos e descargas vulvares (JESUS et al., 2010; KALTUNGO et al., 2014).

O índice de aborto é maior em fêmeas infectadas via genital durante a cobertura e a eliminação do feto pode ser observada a partir do 17º dia de gestação. Abortos no início da gestação normalmente não são percebidos em condições de campo. Infecções entre 35 a 40 dias pós-cobertura, em geral, levam a aborto na metade ou na fase final da gestação. Apenas pequena porcentagem de porcas que abortam, elimina *B. suis* nas secreções genitais por longos períodos de tempo, sendo frequente a eliminação cessar em no máximo 30 dias. Após o aborto, a capacidade reprodutiva pode ser restabelecida depois de um período de descanso de dois a três ciclos estrais (BARTHASSON, 2005).

A infecção dos órgãos genitais dos machos é mais duradoura, podendo persistir durante toda a vida (ACHA, SZYFRES, 2001). Alterações nos testículos e glândulas acessórias geralmente são mais extensas e menos reversíveis que aquelas ocorridas no útero. Os sinais clínicos reprodutivos são a falta de libido e baixo índice de coberturas, frequentemente associados a comprometimento do tecido testicular, orquite, necrose, podendo chegar à esterilidade (BARTHASSON, 2005). Em alguns casos a infecção tende a ser contínua com isolamento do agente no sêmen, com ausência de sinais clínicos (JESUS et al., 2010).

### 3.5 RESPOSTA IMUNE

A proteção contra a infecção por *Brucella* spp. e sua eliminação do hospedeiro depende primariamente da resposta imune mediada por células, ou seja, pela interação de células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos) e de linfócitos T auxiliares e citotóxicos (BRASIL, 2006).

Os macrófagos constituem a primeira linha de defesa da resposta imune inata, eliminando partículas estranhas por fagocitose. Bactérias intracelulares facultativas, como a *Brucella* spp., desenvolveram maneiras de contornar esse mecanismo de defesa evitando sua destruição, pois conseguem se multiplicar e sobreviver dentro destas células (XAVIER et al., 2010).

Bargen, Gorvel, Salcedo (2012) explicaram que esta bactéria se adaptou ao ambiente da célula hospedeira, controlando seu próprio tráfego para evitar a degradação lisossomal e multiplicando-se extensivamente sem restringir as funções celulares básicas ou induzir a morte dessa célula. Ainda assim, mais de 90% das *Brucella* spp. são mortas mais rapidamente após sua fagocitose.

A infecção de suínos com *B. suis* provoca uma forte resposta imune, cujos componentes principais incluem a indução de citocinas de células T, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), e a produção de anticorpos específicos, resultando na sobrevivência do hospedeiro e manutenção do estado infeccioso crônico, geralmente não letal (EFSA, 2009).

Células-T CD4 Th1 produzem o IFN- $\gamma$ , que é considerado a citocina efetora para ativação eficiente de macrófagos no combate e inibição da replicação intracelular. Memória imunológica por células adaptáveis e, talvez, sistemas imunitários em pontes (linfócitos-T e linfócitos-B produtores de anticorpos) parecem ser a chave para respostas imunológicas eficazes (KO, SPLITTER, 2003).

Os anticorpos têm um efeito positivo na proteção contra *Brucella* spp. por meio das suas propriedades opsônicas e capacidade de eliminação complemento-mediado, melhorando a absorção fagocítica e a liberação de aglutinação de bactérias, além de

mediar a citotoxicidade celular anticorpo dependente e, por ligação a receptores bacterianos, evitar a aderência de bactérias aos tecidos do hospedeiro. As respostas imunológicas em suínos não foram devidamente estabelecidas, mas acredita-se que sejam semelhantes como em outras infecções por *Brucella* spp (EFSA, 2009).

Em bovinos infectados por *B. abortus* a resposta imunológica é caracterizada pelo aparecimento de quatro isotipos de imunoglobulinas anti-*Brucella*: IgM, IgG1, IgG2 e IgA. Imunoglobulinas específicas são dirigidas contra o LPS de membrana da *Brucella* sp., principalmente em sua cadeia "O". Na primeira resposta aparece a IgM, aumentando rapidamente até atingir um valor máximo entre 13-21 dias, declinando em seguida, mas permanecendo em níveis detectáveis. O isotipo IgG1, que é considerado o anticorpo mais importante do ponto de vista de diagnóstico, atinge a máxima concentração entre 28-42 dias, porém não apresenta declínio com o passar do tempo. Por volta de duas semanas após a infecção aparecem a IgG2 e a IgA com aumento gradual, mas níveis baixos (DE CARVALHO, 2014; KALTUNGO et al., 2014).

A IgM possui grande capacidade aglutinante nas provas de soroaglutinação em função da sua estrutura pentamérica e decavalência. É o anticorpo predominante na resposta humoral de curta duração contra a maioria dos antígenos bacterianos e principal responsável por reações cruzadas e indesejáveis. Por conta dessa característica, estudam-se modificações nos testes diagnósticos de brucelose para reduzir a atividade desse anticorpo (DE CARVALHO, 2014).

### 3.6 TRANSMISSIBILIDADE

A capacidade de sobrevivência de *Brucella* spp. em condições ambientais é um fator importante na transmissão da doença, sobretudo em ambientes úmidos contendo matéria orgânica, ao abrigo da luz solar direta e em pH neutro (PAULIN, 2003), sendo de até quatro meses em solo úmido, água, urina e leite. Em carcaças e

órgãos pode sobreviver até 135 dias e no sangue a 4°C, 180 dias. Instalações e pastagens podem permanecer contaminadas por períodos de até dois anos e congelada resiste acima desse tempo. Sobrevive em fetos abortados, esterco, palha, feno, equipamentos e roupas, a depender das condições ambientais e de secagem (BARTHASSON, 2005).

A luz solar direta reduz a sobrevivência dessa bactéria, que é inativada pela pasteurização ou cozimento. Geralmente, a remoção de animais infectados, limpeza e desinfecção de locais contaminados e o vazio sanitário, de no mínimo 60 dias, são suficientes para evitar sua disseminação (PAULIN, 2003).

De acordo com EFSA (2009), não existe um relatório que mostre uma diferença específica da resistência de *B. suis* fora do hospedeiro em comparação a outras espécies do mesmo gênero ou entre seus biovars. No entanto, o bv 2 aparece particularmente sensível em comparação com *B. abortus* e *B. melitensis*. Em laboratório, é comum isolar poucas colônias desse biovar em suínos, javalis ou lebres infectados, não sobrevivendo em amostras congeladas de tecido. Supõe-se que, pelo menos, o bv 2 de *B. suis* não sobreviva fora do seu hospedeiro.

Animais silvestres podem funcionar como reservatórios para *B. suis* bv 2 na Europa, a exemplo da lebre europeia (*Lepus europaeus*) e do suíno selvagem (*Sus scrofa*), transmitindo a infecção para os suínos domésticos por contato direto ou indireto, pondo em risco áreas livres (PIKULA et al., 2005). Também pode haver transmissão envolvendo vetores, tais como cães, gatos, aves migratórias, forragens e palha.

Suínos de qualquer faixa etária estão predispostos a contrair a enfermidade, porém a maior susceptibilidade ocorre a partir dos quatro meses de idade, ou seja, durante a maturidade sexual (JESUS et al., 2010). *B. suis* é excretada em grande número e por longos períodos pela urina, descargas uterinas e leite (XAVIER et al., 2009).

A bactéria é transmitida de animal para animal por secreções de forma direta e indireta por meio da ingestão de água e alimentos contaminados. Porcas infectadas podem contaminar seus leitões por via transplacentária, durante a amamentação e via ambiente contaminado. No entanto, a infecção é geralmente temporária em leitões e poucos irão permanecer infectados tornando-se portadores (EFSA, 2009;

OIE, 2012).

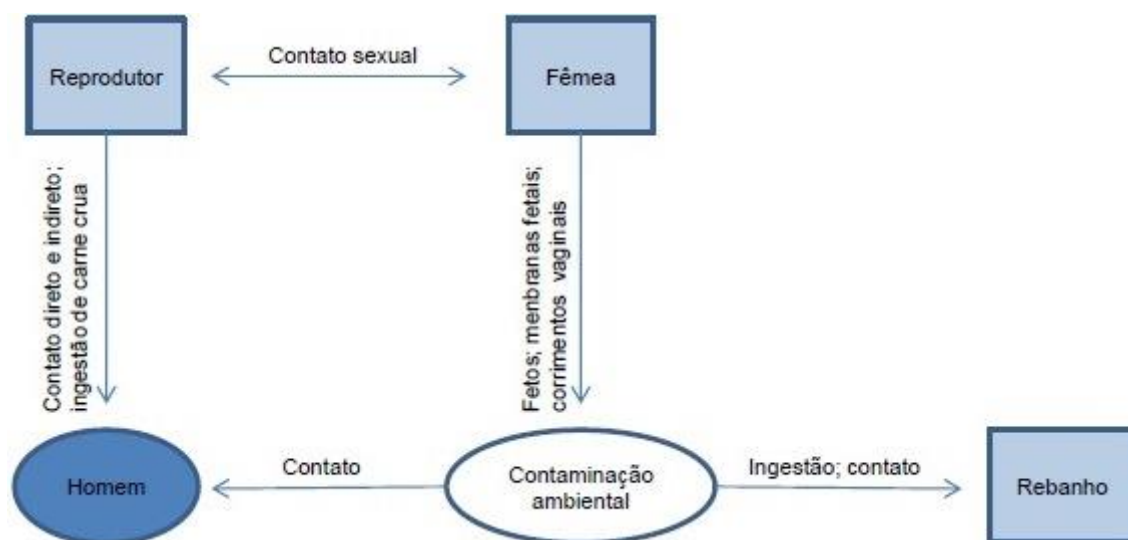


Figura 1: Modo de transmissão da brucelose suína (*B. suis*) (ACHA, SZYFRES, 2001).

Em áreas endêmicas com sinais clínicos leves e sem ser diagnosticada sorologicamente, a doença tende a passar despercebida no rebanho por um longo tempo. Machos aparentemente saudáveis e adquiridos sem exames prévios podem introduzir a doença numa criação livre de brucelose, uma vez que há a possibilidade de não apresentar alterações na atividade reprodutiva ou nos órgãos sexuais (SILVA et al., 2009). As fêmeas também se infectam por meio da inseminação artificial quando utilizado sêmen contaminado com *B. suis* (BIANCHI et al., 2006).

### 3.7 IMPACTO ECONÔMICO E NA SAÚDE PÚBLICA

A OIE (2016) classifica a brucelose como uma doença contagiosa de notificação obrigatória, com impacto econômico significativo devido ao potencial risco de disseminação internacional, disseminação dentro de populações livres,

laboratorialmente classificada como risco III e de relevância zoonótica.

Vários países têm executado programas de controle da brucelose desde o início do século XX, sendo que alguns conseguiram erradicá-la (FERREIRA NETO, 2009). Algumas espécies de *Brucella* sp. representam umas das zoonoses bacterianas mais importantes do mundo (XAVIER et al., 2009).

Um percentual dos animais recupera-se da infecção em torno de seis meses, no entanto a maioria permanece infectada permanentemente (OIE, 2009). A enfermidade também está associada ao aumento da taxa de mortalidade de leitões desmamados por ninhada, podendo alcançar índices de até 80%, mas essa mortalidade é insignificante em adultos. Porcas e cachaços perdem seu valor comercial, podendo ser descartados devido à esterilidade (ROSA, GARCIA, MEGID, 2012).

Dados do MAPA (BRASIL, 2016) mostram que estudos e investimentos na suinocultura brasileira levaram o país a ocupar a quarta posição no *ranking* mundial de produção e exportação de carne suína. No ano de 2015 o Brasil exportou 555 mil toneladas desse produto, das 3.463 milhões de toneladas produzidas (ABPA, 2016).

No entanto, a ocorrência de enfermidades de notificação obrigatória e de importância econômica como a doença de Aujeszky, peste suína clássica e brucelose são uma das principais barreiras sanitárias para o comércio internacional para mercados exigentes, comprometendo assim a competitividade da cadeia produtiva (BRAGA et al., 2013).

Mathias (2008) observou, com a tecnificação das explorações comerciais suinícolas, redução acentuada na prevalência da brucelose nessa espécie, porém, ainda assim, focos esporádicos são passíveis de ocorrer. Apesar das pesquisas sobre a infecção em suínos, as perdas econômicas decorrentes dessa enfermidade ainda não foram bem determinadas no Brasil.

Alguns prejuízos causados à suinocultura foram citados por Matos et al. (2004), como queda na produção de leitões e eliminação de animais de alto valor zootécnico. Também gera perdas reprodutivas, como abortos em qualquer momento

da gestação, natimortos e nascimento de leitões fracos (LOPES, NICOLINO, HADDAD, 2010; BRAGA et al., 2013). Na agricultura familiar, cada animal doente, além de representar prejuízo econômico pela queda na produtividade, também significa risco para a saúde dos demais animais e de humanos (AGUIAR et al., 2006).

Em relação à capacidade zoonótica, *B. suis* apresenta um maior grau de patogenicidade para humanos do que *B. abortus* (BRASIL, 2006; LEITE et al., 2014). A brucelose suína já foi considerada no Brasil, a principal fonte de infecção para o homem, com caráter altamente patogênico (MATOS et al., 2004).

Os humanos não são hospedeiros naturais de *Brucella* spp., portanto sua fonte de infecção geralmente são animais domésticos ou selvagens, que funcionam como reservatórios. A enfermidade configura um risco para a saúde pública, ocorrendo predominantemente de forma ocupacional, mas também pela ingestão de alimentos contaminados (AGUIAR et al., 2006; MATHIAS, 2008). No entanto, a elevada infecciosidade através de aerossóis coloca *Brucella* spp. na categoria “B” da lista dos agentes de guerra biológica, sendo a infecção bacteriana mais comum adquirida em laboratórios de diagnóstico e pesquisa (BARGEN, GORVEL, SALCEDO, 2012).

As maiores taxas de soropositivos são encontradas em médicos veterinários e funcionários de matadouros, contudo, a ineficiência na identificação e diagnóstico da doença causada por *Brucella* spp. no homem, subestima a ameaça para a saúde pública (POESTER, GONÇALVES, LAGE, 2002). Roxo, Bersano, Portugal (1996) afirmam que embora humanos sejam sensíveis a praticamente todas as espécies de *Brucella*, onde há surtos de *B. suis* o número de pessoas contaminadas é mais elevado devido à este agente.

Pessoas que trabalham em criações de suínos ou em abatedouros estão mais propensas à infecção por *B. suis*, podendo se contaminar através da inalação, ingestão ou penetração da bactéria por mucosas ou pele com solução de continuidade. A constante bacteremia torna o consumo da carne suína mal cozida ou crua um risco elevado para os seres humanos (MATOS et al., 2004; ROSA, GARCIA, MEGID, 2012). Outra possibilidade proposta por Carrington et al. (2012) é



a de que a atividade de caça de suínos selvagens pode estar relacionada com relatos de casos de infecção humana por *B. suis*.

Freitas et al. (2001) salientam que o abate clandestino de suínos, uma prática inaceitável e que ainda ocorre na zona rural brasileira, representa um elevado risco sanitário para todas as pessoas, principalmente àquelas diretamente envolvidas. Este risco está associado à exposição ao agente durante a matança sem a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), à ingestão de alimento de qualidade sanitária deficiente e à contaminação do meio ambiente.

A enfermidade não é tão disseminada entre a população humana, mas pode desencadear quadros clínicos graves, com sérias complicações para as pessoas acometidas (MATHIAS, 2008). Apresenta período de incubação aproximado de uma a três semanas e quadro septicêmico. Na fase aguda observa-se febre ondulante, de até 40°C, acompanhada por insônia, fraqueza, anorexia, letargia e impotência sexual, cursando por semanas, meses ou anos (SELEEM, BOYLE, SRIRANGANATHAN, 2010). Já Viana et al. (2014) descreveram que a brucelose humana é normalmente assintomática, podendo ocorrer dores generalizadas, hepatoesplenomegalia, cefaleia, sudorese e alterações gastrointestinais.

De acordo com Seleem, Boyle, Sriranganathan (2010), na ausência de tratamento, a infecção pode se tornar crônica, levando a um quadro debilitante com complicações severas como meningoencefalite, endocardite, artrite, espondilite, orquite, fadiga crônica e distúrbios psicológicos, em que a transmissão direta é rara, porém já houve relatos associados à amamentação e contato sexual. No período de 2008 a 2012, foram notificados 26 casos da doença na Região Nordeste do Brasil, sendo 14 notificações provenientes do estado da Bahia (VIANA et al., 2014).

Para o tratamento da brucelose aguda em adultos é recomendado pela OMS uma associação dos antimicrobianos rifampicina e doxiciclina, porém não há consenso em relação ao melhor regime terapêutico para a brucelose crônica em adultos e brucelose simples ou complicada em crianças com menos de 7 anos de idade. Ainda não existe vacina para humanos (GODFROID et al., 2005) e a taxa de mortalidade é estimada em cerca de 5% dos casos, devido a complicações (DI FEBBO et al., 2012).

### 3.8 DIAGNÓSTICO

Parte essencial de um programa sanitário, o diagnóstico da brucelose em suínos é feito por diferentes métodos que se complementam. Segundo Meirelles-Bartoli (2010), depende da investigação epidemiológica com histórico do rebanho da propriedade e vizinhos, sinais clínicos dos animais suspeitos e diagnóstico laboratorial com exames diretos e indiretos. A interpretação em conjunto de todos os achados é fundamental, pois a doença não se apresenta de forma patognomônica como em ruminantes (EFSA, 2009; PRAUD et al., 2012).

Para a espécie suína, a OIE (2009) indica como diagnóstico da brucelose os testes sorológicos do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Ensaio Imunoenzimático indireto (iELISA) e competitivo (cELISA), Teste de Polarização de Fluorescência (FPA ou TPF) e Fixação de Complemento (FC). O AAT é indicado como um dos melhores para triagem de rebanhos, inclusive recomendado para exportação dos animais.

O MAPA, por meio do PNCEBT, recomenda como testes oficiais para controle da brucelose bovina, o AAT, o Teste do Anel em Leite (TAL), o 2-Mercaptoetanol (2-ME) e FC. Os dois primeiros como testes de triagem e os dois últimos utilizados como confirmatórios. Células inteiras da amostra de *B. abortus* 1119-3 são utilizadas na preparação dos antígenos (BRASIL, 2006).

Devido às reações sorológicas para *Brucella* spp. em suínos serem de natureza incerta, os testes do AAT e 2-ME eram os mais indicados para detecção de *B. suis* em rebanhos. Desenvolvidos para o diagnóstico da brucelose bovina, o iELISA, o cELISA, e o TPF foram também validados para brucelose suína (SILVA PAULO et al., 2000). Para Praud et al. (2012), levando-se em conta as poucas publicações sobre a sensibilidade e a especificidade dos ensaios de triagem para a brucelose em suínos, os testes sorológicos disponíveis podem não ser confiáveis o suficiente para serem usados como padrão-ouro em rotina de diagnóstico individual nesta espécie.

As formas suaves de *Brucella* spp. reagem em testes de aglutinação com anti-soros

preparados contra culturas de *Brucella* lisas. Organismos Gram-negativos morfológicamente relacionados que poderiam ser confundidos com *Brucella* não são aglutinados por estes anti-soros (EFSA, 2009). Ressalta-se que pode ocorrer reação cruzada, especialmente com *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:9, induzindo reações falso positivas devido à estrutura do antígeno de membrana O-LPS ser similar às de *Brucella* lisas, diminuindo assim a especificidade de muitos testes, principalmente para diagnóstico individual (SILVA PAULO et al., 2000; MUÑOZ et al., 2012). Pode acontecer a presença de anticorpos não específicos no soro suíno, provavelmente IgM, que também reduzem a especificidade dos testes convencionais, sobretudo em testes de aglutinação (DI FEBO et al., 2012).

Muitos desses métodos e testes foram desenvolvidos para o diagnóstico da brucelose bovina. Depois foram adaptados para testes em soros de suínos, sendo as cepas de *B. abortus* utilizadas como antígenos para detecção de anticorpos nesta espécie por possuírem os mesmos complexos lipopolissacarídeos da *B. suis*. Diferentes ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e de fluorescência têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da brucelose suína (SILVA PAULO et al., 2000).

D'Ornellas (2014) faz a ressalva de que a bacteriologia de *Brucella* spp. é complexa devido às exigências nutricionais e de atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub>, lento crescimento, baixa sensibilidade e necessidade de trabalho em laboratório de biossegurança de nível 3, o que está levando a mais estudos a respeito dos métodos moleculares, a exemplo do PCR.

Alguns países utilizaram o teste cutâneo de brucelina para identificar rebanhos infectados, por permitir diferenciação da brucelose de reações sorológicas falso positivas (DI FEBO et al., 2012), entretanto, segundo Muñoz et al. (2012), a brucelina não está mais disponível no mercado internacional. Uma outra possibilidade aventada por Di Febo et al. (2012), para o diagnóstico presuntivo da brucelose, é o exame microscópico de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen, modificado pelo Stamp.

Muñoz et al. (2012) expõem que o desempenho adequado de diagnóstico dos testes utilizados é de extrema importância para a avaliação da verdadeira prevalência da

infecção e para a implementação de estratégias eficazes de vigilância e controle. Já Meirelles-Bartoli (2010) pondera que o sucesso do controle da brucelose depende muito da escolha dos testes que serão utilizados para o diagnóstico, adotando-se critérios como custo, praticidade, repetibilidade, sensibilidade e especificidade, além da situação epidemiológica da doença.

### 3.8.1 Diagnóstico clínico

Em suínos os sinais clínicos provocados por *B. suis* não são patognômicos, levando à dificuldade nesse tipo de diagnóstico. As observações básicas são relacionadas aos aspectos reprodutivos, que podem estar acompanhados por distúrbios osteo-articulares, tais como artrite, osteomielite, espondilite e paralisia (XAVIER et al., 2009; XAVIER et al., 2010).

### 3.8.2 Diagnóstico epidemiológico

Dados epidemiológicos baseados no histórico do rebanho de uma propriedade, assim como de seus vizinhos, induzem apenas suspeita da brucelose suína (DE CARVALHO, 2014), em que informações preciosas como o registro das manifestações clínicas, movimentação de compra, venda ou empréstimo de animais e doenças apresentadas pelas pessoas que trabalham diretamente com esses animais, são um suplemento essencial à análise laboratorial e, conseqüentemente, para o diagnóstico confirmatório da brucelose (MEIRELLES-BARTOLI, 2010).

A introdução de animais no rebanho, cuja reposição é feita a partir de fontes externas, é um fator de risco considerado por Azevedo (2006) como de grande importância epidemiológica da brucelose. O aumento do tamanho do rebanho geralmente é acompanhado do aumento da densidade de animais, favorecendo a difusão da infecção, particularmente após episódios de abortamentos. A proximidade de rebanhos infectados com utilização de fontes de água comuns também deve ser considerada.

Como exemplo da importância do diagnóstico epidemiológico, Meirelles-Bartoli (2010) considera que as razões do valor insatisfatório da sensibilidade em alguns testes sorológicos incluem cepas de *B. suis* com baixa imunogenicidade, variação no estágio da doença em uma granja suína infectada e exposição a uma pequena dose infectante com um prolongado período de incubação.

A sequência de diagnósticos utilizados para detectar a brucelose suína deve ser adaptada de acordo com o contexto epidemiológico. Por exemplo, em países europeus onde a brucelose ocorre esporadicamente, um teste com alta especificidade seria útil para evitar resultados falsos positivos em explorações de suínos criados livremente (PRAUD et al., 2012).

### 3.8.3 Diagnóstico laboratorial

#### 3.8.3.1 Sorológico

O sorodiagnóstico é a base do combate à brucelose em rebanhos, por meio do monitoramento de propriedades ou de regiões. Muito útil também em locais onde a doença já foi erradicada. Deve-se atentar para as normas técnicas estabelecidas pelos organismos internacionais, com antígenos padronizados e específicos para cada prova (PAULIN, 2003). Os procedimentos utilizados para a pesquisa da doença em suínos são os mesmos que os descritos para brucelose bovina e bubalina (OIE, 2009).

EFSA (2009) sugere que os desempenhos dos diferentes testes de diagnóstico podem variar sob diversas situações epidemiológicas, o que torna o diagnóstico imunológico da brucelose suína ainda bastante difícil. Os suínos infectados podem produzir nenhum ou poucos anticorpos contra *Brucella* spp., levando a resultados falso-negativos aparentemente pelo estímulo diferente de cada cepa de *B. suis* sobre a resposta imune, além do estágio da doença no rebanho. A dose infectante de *B. suis*, quando baixa, pode levar a um prolongado período de incubação antes

de produzir quantidade suficiente de anticorpos aglutinantes na sorologia (MEIRELLES-BARTOLI, 2010).

A maioria dos testes sorológicos é baseada na aglutinação de antígenos por anticorpos específicos. Em bovinos, as principais classes de imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo são IgG (IgG1 e IgG2) e IgM. A distribuição e o tempo necessário para a detecção dessas imunoglobulinas estão associados a diversos fatores, como o estágio da doença. O desempenho dos testes de sorodiagnóstico da brucelose baseia-se principalmente na detecção do anticorpo IgG1, o mais prevalente em animais naturalmente infectados (POESTER et al., 2010).

Quando os animais são expostos a outros microrganismos, pode levar a reações cruzadas nos testes, nos quais a principal imunoglobulina envolvida é a IgM (GARCIA, 2008). O soro de suíno também pode conter anticorpos não específicos, a exemplo do isotipo IgM, reduzindo ainda mais a especificidade dos testes convencionais (EFSA, 2009). Meirelles-Bartoli (2010) faz lembrar que resultados falso-positivos podem ser induzidos por reações cruzadas com diversos microrganismos a exemplo de *Escherichia coli* sorogrupo O:157, *Salmonella* sorovar Kaufman-White grupo N, e *Y. enterocolitica* sorotipo O:9.

*B. suis* e todas as formas suaves de espécies de *Brucella* reagem em testes de aglutinação com anti-soros produzidos contra culturas de *Brucella* lisas, utilizando principalmente antígenos de *B. abortus* (MOL et al., 2012). Especificamente em relação aos suínos, enquanto RBT e FC são padronizados em relação ao soro padrão internacional da OIE (OIEISS), a padronização dos ELISAs e TPF está sendo desenvolvida, não sendo ainda definida devido à ausência de um soro padrão suíno reconhecido internacionalmente (OIE, 2009).

#### 3.8.3.1.1 Antígeno acidificado tamponado e 2-Mercaptoetanol

A prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) é uma das mais amplamente utilizadas para diagnóstico de infecção por *Brucella* spp. em suínos, sendo recomendada para exportação desses animais (NIELSEN, 2002; PRAUD et al.,

2012; ROSA, GARCIA, MEGID, 2012). É mais utilizada rotineiramente como teste de triagem, sendo considerada superior à SAL, por detectar com maior precocidade as infecções recentes, embora reações falso-positivas e falso-negativas possam ocorrer, levando à subjetividade na leitura da reação (BRASIL, 2006; MOTTA et al., 2010).

O fato de *B. suis* ser uma cultura lisa como *B. abortus* e o teste de soroaglutinação detectar as partes de lipossacarídeo de ambas, o antígeno padronizado comercializado no Brasil e que é utilizado para essas duas espécies (JESUS et al., 2010), é preparado com *B. abortus* amostra 1119/3, na concentração de 8% de volume celular, tamponado em pH ácido 3,65 e corado com o Rosa de Bengala (BRASIL 2006; JESUS et al., 2010; LEITE et al., 2014). A maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação a esta prova (DE CARVALHO, 2014).

É uma prova qualitativa rápida, pois não indica o título de anticorpos do soro testado, prática e de boa sensibilidade. O AAT foi desenvolvido a partir da observação de que a IgG1 bovina é menos ativa em pH neutro. A acidificação do antígeno inibe a aglutinação pelas IgM e favorece a aglutinação com IgG1, aumentando sua especificidade. Por ser um processo físico, é provável que nem todas as IgM tenham sua reatividade reduzida, podendo ser detectadas (PAULIN, 2003; POESTER et al., 2010; DE CARVALHO, 2014), resultando em falsos positivos, mas ainda assim é o melhor teste para rebanhos (MOL et al., 2012).

Conforme recomendado no Manual do PNCEBT, a metodologia do AAT consiste em colocar 0,03 mL do soro em contato com 0,03 mL do antígeno (na concentração de 8% de volume celular, tamponado em pH 3,65 e corado com Rosa de Bengala), em uma placa de vidro quadriculada, seguido de leve homogeneização. Em seguida manter a placa em movimentos rotatórios constantes durante quatro minutos e logo após fazer a leitura observando, com o auxílio de uma caixa com luz (ou aglutinoscópio), a ocorrência dos grumos de aglutinação (BRASIL, 2006; LEITE et al., 2014).

O 2-ME é um método quantitativo seletivo, sensível e com alta especificidade, realizado em tubos mantidos em estufa, com antígeno em concentração de 0,045% e leitura com 48 horas (NARDI JÚNIOR et al., 2012). A especificidade é aumentada pela inibição da atividade aglutinante da IgM mediante processo químico de tratamento do soro com a droga 2-mercaptoetanol, que através do seu radical tiol rompe as pontes dissulfídicas dos pentâmeros de IgM, resultando em monômeros que perdem a capacidade aglutinante, priorizando assim as reações com IgG (PAULIN, 2003; NARDI JÚNIOR et al., 2012).

Soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas no 2-ME e positivas SAL, que não recebe tratamento. Os resultados são interpretados pela diferença entre os títulos dos soros da prova lenta, frente ao soro tratado com 2-ME. Resultados positivos na prova lenta e negativos no 2-ME consideram-se como reações inespecíficas. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG e os animais passam a ser considerados infectados (BRASIL, 2006; DE CARVALHO, 2014).

A maioria das reações inespecíficas é impedida, visto que o tratamento com o mercaptoetanol provoca aumento na sensibilidade do teste pela promoção da reatividade de IgG1, aumentando a tendência em detectá-la, enquanto que a reatividade da IgG2 será reduzida (PAULIN, 2003). Provavelmente o fenômeno ocorra devido ao pH ácido da droga, obtido através da mistura de soro em diversas diluições, a 1 mL de antígeno diluído a 2%, com 1 mL de 2-ME a uma concentração de 0,714% (ALTON, JONES, PIETZ, 1975).

De acordo com Motta et al. (2010), a IN nº 6 de 08/01/2004, que estabelece o regulamento técnico do PNCEBT, não descreve os títulos para o diagnóstico sorológico da brucelose suína no país, sendo adotados os títulos utilizados para bovinos e bubalinos. Tais títulos eram descritos na revogada Portaria nº 23 de 20/01/76 do MAPA.

A prova SAL é padronizada frente a um soro padrão internacional e o resultado expresso em unidades internacionais. Permite identificar uma alta proporção de animais infectados, porém costuma apresentar resultados falso-negativos em



infecção crônica e títulos significativos em animais não infectados como decorrência de reações cruzadas com outras bactérias (BRASIL, 2006). Segundo Paulin (2003), esta técnica demonstra sensibilidade e especificidade baixas em relação a outros testes. No entanto, pode ser usada para detectar infecções agudas (BERCOVICH, 1998).

Como desvantagem, Nielsen (2002) cita que a prova do 2-ME é bastante trabalhosa, utiliza grandes volumes de reagentes, necessita de 48 horas de incubação para obter o resultado, além de ser cancerígeno, devendo ser usada somente em ambientes apropriados e bem ventilados.

As amostras avaliadas como sororreagentes com aglutinação macroscópica ao AAT devem ser confirmadas pelo teste 2-ME executado em paralelo com a prova SAL, sendo considerados verdadeiramente positivos apenas os soros que reagem na triagem e no teste confirmatório, melhorando assim a especificidade final (MOTTA et al., 2010; BRAGA et al., 2013).

#### 3.8.3.1.2 Imunodifusão em gel de ágar

Dificuldades nos testes sorológicos em diferenciar animais vacinados dos naturalmente infectados, levaram alguns pesquisadores a utilizar e adaptar novas técnicas de diagnóstico para brucelose, entre elas a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), que é baseada em uso específico de antígenos de membrana. São relatados diferentes protocolos de extração de polissacarídeos de membrana de *Brucella* spp. e sua aplicação em imunodifusão (MORENO, MAYER, MORIYON, 1987; ZYGMUNT, DUBRAY, 1987; BUNDLE, CHERWONOGRODZKY, PERRY, 1988).

Streck et al. (2007) descrevem o IDGA como um teste simples normalmente realizado pelo método de Ouchterlony & Elek de difusão dupla. Nesta técnica o reagente e os soros podem migrar livremente em um meio semissólido, como o ágar ou a agarose, em sistema radial de perfurações, conforme sua solubilidade e massa molecular, até se ligarem atingindo concentrações ótimas e promovendo a formação

de uma linha de precipitação branca e opaca que é o complexo antígeno-anticorpo. Segundo LORD et al. (1997), é considerando resultado positivo o aparecimento de qualquer precipitado entre os poços de antígeno e anti-soro.

Alguns estudos observaram que a especificidade da IDGA pela concordância de seus resultados negativos diante das provas de soroaglutinação, pode ser considerada superior a 96% (DIAZ-APARICIO et al., 1993; MEGID et al., 1999). No entanto, Megid et al. (1999) não recomendam seu uso como técnica diagnóstica de rotina da brucelose bovina, pois demonstra baixa sensibilidade.

As vantagens mais interessantes dessa técnica podem ser citadas como de execução simples, custo baixo e alta especificidade (CHERWONOGRODZKY, NIELSEN, 1988; LORD et al., 1997; STRECK et al., 2007; XAVIER et al., 2011; MOL et al., 2012). Não é necessária a utilização de equipamentos especiais, o que facilita sua realização em laboratórios de pequeno porte e locais com pouca infraestrutura (STRECK et al., 2007).

No entanto, tem alguns inconvenientes como: período de realização superior a 48h; moderada sensibilidade (STRECK et al., 2007) com diminuição acentuada em infecções crônicas (XAVIER et al., 2011), variando de 50 a 92,7%; especificidade de 94,3 a 100% e alta variabilidade da qualidade de antígenos disponíveis comercialmente (MOL et al., 2012).

#### 3.8.3.1.3 Teste de polarização de fluorescência

É um teste rápido, de simples execução, confiável e com alta sensibilidade e especificidade (MATHIAS et al., 2010), que pode ser realizado a campo, utilizando soro, leite ou sangue total com anticoagulante EDTA (DE CARVALHO, 2014). Comum para o diagnóstico de brucelose em bovinos, tem-se mostrado muito promissor para suínos, já que a reação cruzada com epítomos comuns à *B. abortus* e *B. suis* encontrados na cadeia O, permite o uso de um só antígeno para todas as *Brucella* lisas (PAULIN, 2003).

O antígeno é preparado com o polissacarídeo O de *B. abortus* conjugado com o isotiocianato de fluoresceína (BRASIL, 2006). Fundamenta-se na comparação de velocidade dos movimentos das moléculas em solução, em que o tamanho molecular é o principal fator que influencia na velocidade de rotação, sendo inversamente proporcional. Havendo anticorpos no soro, haverá a formação dos complexos anticorpo-antígenoconjugado, cuja velocidade de rotação será inferior à do antígeno-conjugado isolado (BRASIL, 2006; MATHIAS et al., 2010).

Durante a execução da prova, antes de adicionar o antígeno ao soro, é obtido o "ruído de fundo" da amostra através de uma leitura apenas com o soro diluído. Logo após, o antígeno é adicionado e incubado por dois minutos. Ao final do tempo, faz-se a leitura do resultado, por meio de um analisador de fluorescência polarizada conectado a um microcomputador, subtraindo a leitura final da inicial e o resultado apresentado em unidades de milipolarização –mP. É estabelecido um ponto de corte indicando que soros com resultados acima de um valor são considerados positivos e resultados inferiores são considerados negativos (DE CARVALHO, 2014).

Em estudo realizado na Argentina com soros suíno comprovadamente positivos e negativos, Silva Paulo et al. (2000) constataram especificidade de 98,3% e sensibilidade de 93,8% no teste, sendo possível diferenciar anticorpo para microrganismos com reação cruzada a partir do anticorpo para *B. abortus*.

O bom desempenho, com elevada sensibilidade e especificidade, levou Meirelles-Bartoli (2010) a considerar o TPF promissor para o diagnóstico da brucelose suína, podendo ser utilizado como teste único. Mesmo com o custo mais elevado, o uso seria vantajoso, especialmente em rebanhos suínos com alto valor zootécnico.

#### 3.8.3.1.4 Ensaio Imunoenzimático

A pesquisa em torno do teste denominado ensaio imunoenzimático (ELISA) resultou da necessidade para a automatização do exame sorológico e pelo fato das provas tradicionais não conseguirem detectar todos os animais infectados (BERCOVICH, 1998). Os testes de iELISA e cELISA têm sido desenvolvidos para diagnóstico da

brucelose em suínos individualmente, permitindo o rastreio de um grande número de soros (OIE, 2009). A alta sensibilidade e especificidade levaram alguns países a empregar esses métodos nas rotinas sorológicas, em substituição à tradicional combinação do AAT na triagem e da FC para confirmação (PAULIN, 2003).

Vários protocolos do iELISA têm apresentado bons resultados por possuir alta sensibilidade, entretanto sua especificidade assemelha-se a do AAT. O antígeno empregado é o LPS de *B. abortus* imobilizado em placas de 96 poços. Como conjugado é utilizado um anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina com peroxidase e agentes quelantes, para minimizar reações não específicas (BRASIL, 2006).

Soro de suíno pode conter anticorpos inespecíficos, provavelmente IgM, que reduzem a especificidade dos testes convencionais, especialmente por aglutinação. Uma vantagem da técnica de ELISA é a avaliação dos resultados que pode ser realizada por programas de computadores, pequena quantidade de soro necessário para exame, além de ser útil em condições nas quais os métodos convencionais são ineficazes (má qualidade do soro principalmente por hemólise) (SZULOWSKI et al., 1999; JUNGENSEN et al., 2006; ŠPIČIĆ et al., 2013).

Por ser muito sensível e específico o cElisa é recomendado pela OIE como teste confirmatório para o diagnóstico de brucelose, no entanto seu custo é elevado. Nele utiliza-se também o LPS de *B. abortus* como antígeno imobilizado na fase sólida. No momento da prova, o soro a testar é misturado com um anticorpo monoclonal específico contra a cadeia "O" de *B. abortus*. Um conjugado peroxidase-anti-IgG é utilizado para detectar essa ligação anticorpo-antígeno. Quanto maior a quantidade de anticorpos anticadeia "O" de *Brucella* sp. no soro, maior a competição com o anticorpo monoclonal específico e menor a quantidade de cor desenvolvida. Por comparação com um controle, é possível determinar a quantidade relativa de anticorpos anti-*Brucella* no soro teste (BRASIL, 2006).

Algumas desvantagens são apresentadas, principalmente em relação ao investimento inicial, que requer instalações laboratoriais adequadas com pessoal treinado, inviabilidade para análise de poucas amostras de soro (BERCOVICH,

1998) e impossibilidade de distinguir animais vacinados de infectados (COLLING, 1998; PAULIN, 2003; GARCIA, 2008).

O ELISA pode ter limitações importantes na detecção de amostra individual, porém são suficientes para detectar um grupo infectado (GODFROID et al., 2013). Especificamente em relação ao iELISA, não é possível diferenciar anticorpo para microrganismos com reação cruzada a partir do anticorpo para *B. abortus*, resultando em menor especificidade (SZULOWSKI et al., 1999; SILVA PAULO et al., 2000). No entanto, Colling (1998) observou que o cELISA II, com antígeno LPS e anticorpo monoclonal Mab 84 como reagente, ajudou a resolver as reações cruzadas com *Y. enterocolitica*.

Colling (1998) conclui sobre a importância do desenvolvimento e utilização de kits ELISA internacionalmente padronizados e validados contra as principais epizootias. Não se conseguiu estabelecer inicialmente um “*cut-off*” universal para este ensaio em brucelose, sendo necessário realizar este exercício para cada população de rebanho definido, de diferentes países e regiões, podendo depender de fatores como *status* de prevalência e vacinação.

Di Febo et al. (2012) sugeriram que a combinação dos métodos iELISA e cELISA com TPF aumenta a sensibilidade e especificidade, fornecendo uma solução apropriada para o diagnóstico sorológico de brucelose suína.

#### 3.8.3.1.5 Fixação de complemento

Diversos países que conseguiram erradicar a brucelose ou estão em fase de erradicá-la, têm empregado a reação de Fixação de Complemento (FC) como teste confirmatório da brucelose. É o teste de referência recomendado pela OIE para o trânsito internacional de animais (NIELSEN, 2002).

Devido à sua especificidade, tornou-se o teste mais importante para identificação de bovinos infectados com *Brucella*, baseado na detecção de anticorpos específicos IgM e IgG1 que fixam o complemento. O isotipo IgG1 é muito mais efetivo como

fixador do complemento e IgM é parcialmente destruída durante a inativação (BERCOVICH, 1998).

Segundo Paulin et al. (2002), a IgG2 reage normalmente com o antígeno, embora não fixe complemento, e quando em predominância gera o fenômeno de prozona, ou seja, a IgG2 bloqueia o acesso de IgG1 ao antígeno levando a reações falso negativas. Acredita-se que esse evento pode ser devido a exposições repetidas ao agente, condições ambientais levando a estresse, idade avançada do animal e a transferência ativa de IgG1 para o colostro no período peri-parto. Porém o anticorpo IgG1 predomina sobre a classe IgG2 em animais infectados.

É um exame considerado padrão ouro para avaliação de outras provas sorológicas (PAULIN, 2003), porém não é um teste tão efetivo para a detecção de anticorpos contra *Brucella* em suínos, pois o efeito da infecção é mais variável entre indivíduos do que em quaisquer outras espécies domésticas, sendo desaconselhado para suínos individualmente (SILVA PAULO et al., 2000; EFSA, 2009).

É um teste complexo que precisa de pessoas treinadas para execução em laboratório bem equipado, além de bastante trabalhoso pelo uso de reagentes lábeis, o que leva a necessidade de titulação frequente (BERCOVICH, 1998). Uma variação mais prática, que tem sido usada como prova confirmatória em programas de controle e erradicação de muitos países, é a técnica a quente, que diminui as reações anticomplementares e elimina a IgM, aumentando assim a especificidade do teste (PAULIN, 2003).

### 3.8.3.2 Biologia molecular

A identificação de *Brucella* spp. utilizando técnicas microbiológicas convencionais é demorada, perigosa, com baixos limites de detecção e altamente seletivas (AL DAHOUK et al., 2007). A biologia molecular tem contribuído valiosamente com o diagnóstico da brucelose, reduzindo o tempo e melhorando a precisão dos resultados (WHATMORE et al., 2005). Apesar do elevado grau de homologia do DNA dentro do gênero *Brucella*, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos

para permitir a diferenciação entre as espécies e alguns dos seus biovars, fornecendo informações epidemiológicas adicionais (EFSA, 2009; SOLA et al., 2014).

Nos últimos anos, os métodos de diagnóstico direto baseados em Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) tornaram-se cada vez mais importantes como métodos rápidos e confiáveis para detectar fragmentos de DNA específicos de *Brucella* a partir de material de colônias ou diretamente de amostras de campo (HÄNSEL et al., 2015), permitindo a identificação adequada das espécies desse gênero.

A PCR foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 80 e permite a detecção de fragmentos específicos de DNA, por meio da amplificação enzimática *in vitro*, identificando o ácido nucléico do agente, facilitando o diagnóstico direto de doenças infecciosas e superando as limitações inerentes ao isolamento de microrganismos (NOVAIS, PIRES-ALVES, 2004; SOLA et al, 2014). Pode utilizar material de aborto, secreções e excreções, sendo uma técnica muito específica e sensível, mas requer pessoal treinado e equipamentos sofisticados (BRASIL, 2006; DE CARVALHO, 2014).

Inicialmente, estimativas de especificidade e sensibilidade eram difíceis de afirmar devido à discrepância dos protocolos de ensaio descritos em publicações. No entanto, de uma maneira geral, apresentavam menor sensibilidade de diagnóstico do que culturas, mas sua especificidade poderia chegar próximo a 100%, dependendo das amostras e animais apreciados (GODFROID et al., 2013).

Na reação de PCR convencional, o fragmento alvo é detectado por eletroforese em gel, necessitando de um ligante de DNA para obter a coloração do produto de amplificação, acarretando assim um tempo maior para a visualização dos resultados, além da possibilidade de contaminação, podendo gerar resultado falso positivo (MACKAY, 2004; SOLA et al., 2014).

Em 1997 foi criado o banco de dados Genomas OnLine (GOLD), um recurso abrangente com o objetivo de catalogar e monitorar continuamente estudos genéticos em todo o mundo, proporcionando uma base de dados centralizada de sequenciamento de genomas (REDDY et al., 2014). A base de dados PATRIC

(Centro de Integração de Recursos PathoSystems) também permite encontrar grupos de genes de assinatura única para *Brucella* spp., assim como para *B. suis* (EFSA, 2009).

O primeiro PCR específico e mais popular para diferenciar *Brucella* spp. em espécies foi o AMOS PCR (BRICKER, HALLING, 1994; AL DAHOUK et al., 2007), que se baseia no local de inserção da sequência IS711 que é específica no cromossoma desse gênero e resulta num perfil de PCR original para estirpes pertencentes a cada uma das espécies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*, levando ao nome AMOS (MORENO, CLOECKAERT, MORIYÓN, 2002; POESTER et al., 2010; GODFROID et al., 2011). No entanto, outras espécies de *Brucella* como *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* e *B. ceti* e alguns biovars de *B. abortus* (bv 3; 5; 6; 7 e 9) e *B. suis* (bv 2; 3; 4 e 5) não podem ser detectados por essa técnica (LÓPEZ-GOÑI et al., 2008; POESTER et al., 2010).

Melhorias no AMOS PCR foram introduzidas ao longo dos anos para aprimorar seu desempenho, através da incorporação de *primers* específicos para a identificação das cepas da vacina S19 e RB51 (BRICKER, HALLING, 1995; BRICKER et al., 2003; LÓPEZ-GOÑI et al., 2008; POESTER et al., 2010). Uma outra modificação chamada BaSS-PCR (*Brucella abortus Strain Specific*) foi desenvolvida para identificar as estirpes de campo de *B. abortus* bv 1; 2 e 4 diferenciando-as de cepas vacinais e outras espécies de *Brucella* de bovinos (POESTER et al., 2010).

Barllozari et al. (2015) utilizaram o protocolo AMOS-PCR com iniciadores (*primers*) descritos na literatura. A técnica descreve que os produtos *omp2a* e *omp31* do PCR foram submetidos a Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) por digestão de endonuclease de restrição com NcoI (*omp2a*) e Avall (*omp31*), em que a identificação do biovar foi realizada com testes adicionais, demonstrando a presença de *B. suis* bv 2.

A necessidade de complementação da técnica de PCR desenvolvida por Mullis somada à descoberta de fluoróforos, levou ao desenvolvimento do PCR em Tempo Real (RT-PCR) associado à utilização da tecnologia óptica e da informática, possibilitando o monitoramento da reação a cada momento e revolucionando os



processos de quantificação de fragmentos de DNA e RNA, o que faz levar vantagem em relação à PCR qualitativa tradicional por gerar resultados com maior sensibilidade, precisão e velocidade nas análises, facilidade na quantificação, reprodutibilidade, acurácia, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação (NOVAIS, PIRES ALVES, 2004; SOLA et al., 2014).

Foi descrito por Gopaul et al. (2008), o RT-PCR para a identificação de todas as espécies de *Brucella* baseadas em polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) através de qualquer extensão do iniciador. É um teste rápido, simples e inequívoco, em uma análise filogenética robusta e extensa. No entanto Al Dahouk et al. (2007) esclarecem que, mesmo com tantas melhorias tecnológicas, há limitações nesse teste para identificação de *B. abortus* e *B. suis*, devido à escassez de dados.

Hänsel et al. (2015) desenvolveram um ensaio quantitativo de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *B. suis* bv 1 e 4. Este ensaio desempenharia um papel fundamental na melhoria da vigilância em suínos domésticos para amostras clínicas com suspeita de brucelose, sendo rápido e confiável, com apresentação de 100% de especificidade e eficiência média de 95%.

Outros ensaios foram desenvolvidos, sendo proposto o PCR multiplex Bruce-ladder para uma rápida e simples identificação, por única etapa, de todas as espécies de *Brucella*, incluindo aquelas encontradas em mamíferos marinhos, e de vacina S19, RB51 e Rev1 (LÓPEZ-GOÑI et al., 2008), capaz de identificar *B. abortus* bv 3; 5; 6; 7 e 9, e *B. suis* bv 2; 3; 4 e 5, no entanto há o inconveniente de que algumas cepas de *B. canis* podem ser identificadas erroneamente como *B. suis* (GODFROID et al., 2011; GODFROID et al., 2013).

Sola et al. (2014) acreditam que a detecção do DNA do agente bacteriano pela PCR apresenta a vantagem de detectar pequenas quantidades de microrganismos em diferentes substratos, sem a necessidade de estarem viáveis, como ocorre na cultura bacteriológica, reduzindo os riscos na manipulação, além da rapidez, pois é obtido em menos de 24h, e com sensibilidade no resultado.

Outros métodos têm sido descritos incluindo sequenciamento multilocus (MLSA) abrindo o caminho para a caracterização detalhada da estrutura da população

mundial de *Brucella* spp. (WHATMORE, PERRETT, MACMILLAN, 2007). A comparação das sequências já identificadas com outros genomas de *Brucella* poderá apresentar ainda mais *insights* sobre o comportamento deste gênero tão amplo (LEDWABA, MAFOFO, VAN HEERDEN, 2014).

### 3.8.3.3 Isolamento e identificação

Para um diagnóstico mais preciso e definitivo, utiliza-se o isolamento e identificação de *Brucella* spp. a partir dos animais infectados (DI FEBBO et al., 2012; MUÑOZ et al., 2012; PRAUD et al., 2012), com técnica sensível quando realizada em laboratórios capacitados e experientes (GARCIA, 2008). Por ser um diagnóstico definitivo, a escolha das amostras assume grande importância e normalmente depende dos sinais clínicos observados.

Quando a brucelose é clínica, pode-se escolher secreções vaginais, estômago, baço e pulmão de fetos abortados, membranas fetais, colostro ou leite, sêmen, fluidos recolhidos a partir de artrite ou higroma, abscessos e sangue total. Se a amostra for proveniente de carcaças, os tecidos preferidos são os órgãos genitais, baço, fígado, rins, o útero no final da gestação ou início do pós-parto e gânglios linfáticos da cabeça, escapular, ílaco, crural, mamários ou testicular (PAULIN, 2003; DE MIGUEL et al., 2011; GODFROID et al., 2013).

O sucesso do isolamento depende dos cuidados na coleta, processamento, conservação e do número de amostras coletadas de um mesmo animal em função de que tecidos provenientes de abortos podem conter mais de  $10^{13}$  bactérias por grama, o que é favorável, enquanto que linfonodos, leite e sangue de animais infectados apresentam uma dose infectante mais baixa, tornando mais difícil o isolamento (GARCIA, 2008).

As amostras para isolamento são colocadas diretamente em meios de cultura simples ou seletivos, como meio Farrell ou meio Thayer-Martin modificado (DI FEBBO et al., 2012). *B. suis* cresce no meio usual para *Brucella*, sem a adição de soro ou de enriquecimento da atmosfera com dióxido de carbono. No entanto, *B. abortus* pode

infectar suínos, sendo recomendado incubar placas de cultura também a 37°C em ar suplementado com 5-10% (v/v) de CO<sub>2</sub> (EFSA, 2009).

Meios de cultura basal são os de eleição para isolamento da maioria das espécies de *Brucella* spp., sendo recomendados os meios de cultura seletivos devido ao crescimento de grande número de contaminantes que podem estar presentes em amostras colhidas a campo (MARÍN, ALABART, BLASCO, 1996). Segundo De Miguel et al. (2011), esses contaminantes provocam a redução da sensibilidade do diagnóstico bacteriológico e podem ser representados por fungos ou bactérias comensais e do ambiente de coleta.

A seletividade do meio Farrel, indicado para amostras lisas de *Brucella* spp., ocorre devido à utilização de antibacterianos e antifúngicos (MARÍN, ALABART, BLASCO, 1996; STACK, HARRISON, PERRETT, 2002), como por exemplo ácido nalidíxico, bacitracina, ciclohexamida, nistatina, polimixina B e vancomicina (SOLA et al., 2014).

O tempo de incubação necessário para o isolamento de *Brucella* spp. varia desde 72 horas após a semeadura até o período de quatro semanas (GARCIA, 2008). Uma vez isolada, a *Brucella* é identificada por meio das suas características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (PAULIN, 2003; MEIRELLES-BARTOLI, 2010). As provas bioquímicas catalase, oxidase, urease, redução de nitratos e a produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) foram preconizadas para a identificação de *Brucella* spp. (GODFROID et al., 2013).

Outras avaliações são utilizadas para complementar essa identificação, a exemplo do requerimento de CO<sub>2</sub> para o crescimento, a morfologia colonial, o hospedeiro preferencial, a sensibilidade a corantes, a fagotipagem e a aglutinação com soros mono-específicos (GARCIA, 2008). Colônias de *Brucella* spp. são pequenas, translúcidas, às vezes de coloração leitosa, brilhantes, convexas, de bordas arredondadas e bem definidas, sendo observadas isoladas, aos pares ou em pequenos grupos (PAULIN, 2003).

O método de diagnóstico padrão-ouro em identificação das espécies de *Brucella* é o isolamento e tipificação em biovars (DI FEBO et al., 2012; MUÑOZ et al., 2012; PRAUD et al., 2012), assumindo grande importância sob o ponto de vista

epidemiológico. O bv 1 da *B. suis* é o único que produz sulfureto de hidrogênio e algumas estirpes podem ser atípicas resistindo à fucsina básica. Os três biovars mais importantes envolvidos 1; 2 e 3 aglutinam com o antissoro mono específico A e não com H (EFSA, 2009).

Isolamentos de *Brucella* spp. foram realizados por Barllozari et al. (2015) por meio de material proveniente de suínos com problemas reprodutivos, utilizando enriquecimento de culturas em caldo Trypticase-soy + soro eqüino 5% com anfotericina B, polimixina B, bacitracina e vancomicina, em meio Farrell e meio modificado Thayer Martin, com incubação a 10% de CO<sub>2</sub> e em condições aeróbias, confirmados posteriormente em PCR, com identificação de *B. suis* bv 2.

A bacteriologia da *Brucella* é um risco para as pessoas que manuseiam a bactéria viva (DI FEBO et al., 2012; MUÑOZ et al., 2012; PRAUD et al., 2012) e poucos são os laboratórios que realizam este exame, além de ser uma técnica complexa com processo trabalhoso e lento (GARCIA, 2008), não sendo viável para ser realizada individualmente em grandes populações (MUÑOZ et al., 2012; PRAUD et al., 2012).

### 3.9 CONTROLE E PREVENÇÃO

No Brasil o PNCEBT indica que o controle da brucelose suína seja feito de acordo com as normas de certificação de granjas de suídeos da Secretaria de Defesa Agropecuária, que estabelecem procedimentos de diagnóstico e controle na população de reprodutores (BRASIL, 2015), mas nada é citado em relação às criações não comerciais ou de subsistência.

Em Granjas Reprodutoras de Suídeos Certificadas (GRSC), o Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS) prevê que devem ser realizadas provas sorológicas com intervalo de seis meses, utilizando o teste AAT e os soros reagentes submetidos à prova confirmatória 2-ME ou FC. Todos os cachos e matrizes são testados ao

primeiro exame do rebanho, porém os monitoramentos posteriores serão feitos por amostragem, com o número de animais a serem testados dependendo do número de reprodutores no plantel (BRASIL, 2002).

Várias medidas podem ser aplicadas para reduzir a propagação da infecção por *B. suis* dentro e entre explorações suínas (EFSA, 2009). Em áreas endêmicas os testes sorológicos a cada seis meses com a eliminação dos positivos têm gerado bons resultados. Em países onde essa doença raramente ocorre ou que estão em fase de erradicação, a eutanásia de animais reagentes também é uma ferramenta fundamental, lembrando que reprodutores devem ser testados antes de serem introduzidos no rebanho (BARTHASSON, 2005).

O controle da doença seria mais facilmente alcançado se vacinas eficazes estivessem disponíveis. Schuring, Sriranganathan, Corbel (2002) relatam a fabricação de uma vacina via oral, que foi utilizada durante muitos anos na China para prevenção da doença em suínos, bovinos e cabras, denominada vacina M, derivada de *B. suis*. Vacinas produzidas com *B. abortus* não mostraram bons resultados no controle da brucelose suína (MEIRELLES-BARTOLI, 2010). Comercialmente não há vacinas contra *B. suis* no Brasil, então a prevenção é feita por medidas que reduzem o risco de infecção, através de manejo adequado e higiene nos criatórios, além da realização periódica de testes sorológicos.

Para erradicar a enfermidade é preciso a identificação dos animais infectados, sua eliminação do rebanho e substituição por outros não infectados, além de evitar contato desses animais com outros rebanhos, suínos selvagens e possíveis vetores. Plantéis livres podem ser protegidos testando todos os animais antes da sua admissão (EFSA, 2009). Programas de controle da brucelose e campanhas de educação sanitária são fundamentais para esclarecimento de pecuaristas a respeito de sintomas nos animais e a necessidade de investigação da enfermidade, além dos riscos para a saúde pública (MATHIAS, 2008; KALTUNGO et al., 2014).

**ARTIGO 1**

Artigo a ser submetido ao comitê editorial do periódico científico Ciência Rural.

1 **Inquérito soroepidemiológico para brucelose em criações extensivas de suínos no Estado**  
2 **da Bahia, Brasil**

3

4 **Serological survey for brucellosis in extensive pig herds in the State of Bahia, Brazil.**

5

6 BATISTA, Manoela Barbosa<sup>I</sup>; CERQUEIRA, Robson Bahia<sup>II\*</sup>; ALVES, Thaise Marques<sup>III</sup>;  
7 ALVES, Juliana Gomes Pires<sup>III</sup>, BACELAR, Felipe Ramon<sup>III</sup>, BATISTA, Marcio Santos<sup>I</sup>,  
8 MAIER, Isabel<sup>I</sup>

9 <sup>I</sup>Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB, Feira de Santana, Bahia,  
10 Brasil.

11 <sup>II\*</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e  
12 Biológicas, Cruz das Almas, Bahia, Brasil

13 <sup>III</sup>Graduando pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,  
14 Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, Bahia, Brasil

15 \*Autor para correspondência: robsonba@gmail.com

16

17 **RESUMO:**

18 A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa que causa comprometimento reprodutivo  
19 em várias espécies de mamíferos, com evolução geralmente crônica, considerada uma das  
20 mais importantes e difundidas zoonoses no mundo. No Brasil a sorologia aplicada para  
21 diagnóstico da brucelose em suínos detecta positividade para amostras lisas de *Brucella* spp.,  
22 no entanto não se pode afirmar se estes animais se encontram infectados por *B. abortus* ou por  
23 *B. suis*, havendo a preocupação de que esta última esteja emergindo como um agente de

24 infecção em bovinos. Em face da necessidade de demonstrar a situação epidemiológica entre  
25 as espécies que possam atuar como reservatórios da bactéria procedeu-se o presente estudo  
26 com o objetivo de realizar um inquérito soroepidemiológico no estado da Bahia sobre a  
27 brucelose suína. Para o experimento, utilizou-se 889 amostras de soro suíno provenientes de  
28 320 propriedades, distribuídas por 96 municípios baianos, armazenadas no Laboratório de  
29 Sanidade Animal da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal (LADESA-ADAB). As  
30 amostras foram submetidas aos testes AAT e ELISA indireto (iELISA) no Laboratório de  
31 Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (LDI-UFRB). Ao teste  
32 do AAT, 42 amostras (4,72%) apresentaram reação de aglutinação, num total de 32  
33 propriedades (10%). Estes soros foram encaminhados ao LADESA-ADAB para confirmação  
34 por meio da prova do 2-ME/SAL, com apenas 01 (um) resultado positivo. Todos os soros  
35 foram testados no iELISA, com antígeno de *B. abortus*, detectando 10 animais positivos  
36 (1,12%) em 9 propriedades (2,81%). Fica evidenciada a presença de *Brucella* spp. na espécie  
37 suína no Estado da Bahia, que pode comprometer avanços no Programa Nacional de Controle  
38 e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), além do eminente risco para a saúde  
39 pública.

40

41 **PALAVRAS-CHAVE:** *Brucella* spp.; brucelose suína; ELISA indireto

42

43 **ABSTRACT:**

44 The brucellosis is an infectious disease that causes reproductive impairment in several species  
45 of mammals, usually chronic course, considered one of the most important and widespread  
46 zoonoses in the world. The serology applied for the diagnosis of swine brucellosis in Brazil  
47 detects positive results to smooth samples of *Brucella* spp., nonetheless it cannot be stated



48 whether these animals are infected with *B. abortus* or *B. suis*, there is concern that the latter is  
49 emerging as an agent of infection in cattle. Given the need to demonstrate the epidemiological  
50 situation among the species that can act as reservoirs of bacteria, this study was carried out  
51 with the aim of conducting a seroepidemiological survey in the state of Bahia on swine  
52 brucellosis. For the experiment, it was used 889 samples of swine sera from 320 properties  
53 spread over 96 municipalities in Bahia, stored in the Animal Health Laboratory of the State  
54 Animal Health Agency (LADESA-ADAB). The samples were submitted to the BPAT and  
55 indirect ELISA (iELISA) tests in Infectious Diseases Laboratory of the Federal University of  
56 Bahia Recôncavo (LDI-UFRB). To BPAT, 42 samples (4.72%) showed agglutination  
57 reaction, a total of 32 properties (10%). These sera were sent to LADESA-ADAB to  
58 confirmation by proof of 2-ME/TAT, with only 01 (one) positive result. All sera were tested  
59 in iELISA with antigen from *B. abortus*, detecting 10 positive animals (1.12%) in 9 (2.81%)  
60 properties. It is evidenced the presence of *Brucella* spp. in swine in the state of Bahia, which  
61 may compromise progress of the National Programme for Control and Eradication of  
62 Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT), and imminent risk to public health.

63

64 **KEYWORDS:** *Brucella* spp.; swine brucellosis; indirect ELISA

65

## 66 **INTRODUÇÃO**

67 O Brasil se destaca como grande produtor mundial de carne suína, ocupando o quarto lugar  
68 em produção e exportação com 555 mil toneladas embarcadas em 2015 (ABPA, 2016), em  
69 um total de 39,26 milhões de cabeças de suínos abatidos (IBGE, 2016). Segundo a Pesquisa  
70 Pecuária Municipal de 2013 do IBGE, o Nordeste apresenta o terceiro maior rebanho  
71 brasileiro com 5,6 milhões de cabeças, ressaltando que nesta região a produção é mais voltada

72 para subsistência (DE ZEN et al., 2015). A Bahia possui o maior rebanho suíno do Nordeste  
73 com 1,62 milhões de animais (IBGE, 2011).

74 As condições sanitárias dos rebanhos são um dos fatores mais importantes para a  
75 comercialização de animais e seus produtos, por vezes sendo exigida declaração de área/país  
76 livre de determinadas doenças, com controle realizado pela Organização Mundial de Saúde  
77 Animal (OIE). Dentre as enfermidades relacionadas à suinocultura, destaca-se a brucelose,  
78 que pode causar grandes perdas econômicas (BARTHASSON, 2005).

79 Caracterizada como uma enfermidade infectocontagiosa que causa comprometimento  
80 reprodutivo em várias espécies de mamíferos, com evolução geralmente crônica, pela  
81 infecção de células do sistema mononuclear fagocitário (PAULIN, 2003), é uma das mais  
82 importantes e difundidas zoonoses no mundo (POESTER et al., 2002).

83 Desde o ano de 1997 já havia a preocupação de que *B. suis* estaria emergindo como um  
84 agente de infecção em bovinos, ampliando a possibilidade de infectar seres humanos, como  
85 tem sido observado em alguns países da América do Sul, particularmente no Brasil e na  
86 Colômbia, onde *B. suis* biovar 1 tornou-se estabelecida CORBEL (1997).

87 BRAGA et al. (2013) observaram que dados sobre a prevalência da brucelose suína no Brasil  
88 são escassos, apesar da importância do seu conhecimento no aspecto econômico e na saúde  
89 pública, o que poderia viabilizar e melhor direcionar medidas de controle e profilaxia,  
90 diminuindo prejuízos financeiros e risco de transmissão zoonótica. A sorologia aplicada para  
91 diagnóstico em suínos detecta positividade para amostras lisas de *Brucella* spp., no entanto  
92 não se pode afirmar se a infecção é por *B. suis* ou por *B. abortus* (AGUIAR et al., 2006;  
93 ROSA et al., 2012).

94 No Brasil, estudos sobre a prevalência da brucelose em suínos foram realizados no Sul e  
95 Sudeste, além de alguns inquéritos pontuais no Nordeste, região que se caracteriza em sua

96 maioria por pequenos produtores com criações mistas de várias espécies (LEITE et al., 2014).  
97 A ausência de diagnóstico rotineiro deixa uma lacuna na real situação epidemiológica da  
98 brucelose suína no Brasil (ROSA et al., 2012).  
99 Em sistemas industriais de produção de suínos a prevalência é muito baixa, contudo pode ser  
100 elevada entre porcos para subsistência, que vivem soltos, buscando seu próprio alimento ou  
101 alimentando-se de restos de refeições fornecidos pelos proprietários (XAVIER et al., 2009;  
102 BRAGA et al., 2013).  
103 A transmissão entre os animais, de qualquer idade, ocorre por meio da ingestão de água e  
104 alimentos contaminados, contato direto com descargas vulvares, membranas fetais ou fetos  
105 abortados, além do sêmen (SILVA et al., 2009). Os sinais clínicos dependem da idade do  
106 animal, tempo de exposição e órgão acometido (MEGID et al., 2010). Em fêmeas o mais  
107 comum é o aborto em qualquer estágio da gestação, podendo ocorrer natimortos (JESUS et  
108 al., 2010). Nos rebanhos cronicamente infectados a infertilidade é o sinal clínico mais  
109 relevante (OIE, 2009).  
110 Considerando o caráter de enfermidade pouco diagnosticada e estudada em suínos e em face  
111 da importância do controle da brucelose para a pecuária e a saúde pública, objetivou-se  
112 demonstrar, por meio de estudo soropidemiológico, que suínos criados extensivamente  
113 podem estar infectados por *Brucella* spp., podendo funcionar como hospedeiro da *B. abortus*,  
114 demonstrando seu papel na disseminação desta enfermidade e na saúde pública.

115

## 116 MATERIAL E MÉTODOS

117 O inquérito sorológico para Peste Suína Clássica (PSC) em todo o estado da Bahia no ano de  
118 2012, visitou 320 propriedades, distribuídas em 96 municípios nas diversas regiões do estado,  
119 totalizando 889 amostras de soro suíno que foram utilizadas neste estudo. Os soros estavam

120 acondicionados em microtubos de polipropileno previamente identificados e mantidos  
121 congelados a -20°C no LADESA-ADAB conforme recomendação do Ministério da  
122 Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), até o momento da realização das provas  
123 sorológicas, quando as amostras foram conduzidas para o LDI-UFRB. Todo o inquérito foi  
124 realizado seguindo determinação do MAPA, por meio do Programa Nacional de Sanidade  
125 Suídea (PNSS). As propriedades foram escolhidas aleatoriamente em criações de subsistência,  
126 de acordo com cadastro realizado pelo órgão estadual de fiscalização, ADAB. Foram  
127 selecionados animais acima de seis meses de idade, independente de sexo e raça,  
128 configurando o total de 322 machos e 567 fêmeas, todos nascidos nos próprios  
129 estabelecimentos. A amostragem foi definida com base na quantidade de criadores nos  
130 municípios e de acordo com a quantidade de suínos na propriedade, não excedendo o máximo  
131 de trinta animais por produtor. Como não há um padrão de soro suíno internacional comum de  
132 *Brucella* disponível para calibrar os testes específicos nessa espécie, todas as análises  
133 sorológicas foram realizadas com antígenos de *B. abortus*, por apresentarem as mesmas  
134 características de espécie lisa como *B. suis* (JUNGERSEN et al., 2006).

135 No LDI-UFRB foi realizado o teste de triagem com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)  
136 produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR<sup>®</sup>), utilizando suspensão inativada  
137 pelo calor de *B. abortus* amostra 1119-3, concentração de 8% de volume celular, tamponado  
138 em pH ácido de 3,65 e corado com Rosa de Bengala. A técnica foi executada de acordo com a  
139 Instrução Normativa n° 41, de 24 de novembro de 2006 (BRASIL, 2009), observando que  
140 qualquer presença de aglutinação é considerada prova positiva. As amostras reagentes foram  
141 submetidas às provas conjuntas de Soroaglutinação Lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-ME)  
142 realizadas no LADESA-ADAB. Foi utilizado antígeno de célula total para soroaglutinação  
143 lenta, preparado com *B. abortus* amostra 1119/3 inativada, na concentração final de 0,045%

144 de volume celular, produzido pelo TECPAR<sup>®</sup> (AGUIAR et al., 2006). Pelo fato de não se  
145 vacinar suínos, a interpretação da prova 2-ME/SAL seguiu a orientação do quadro das fêmeas  
146 não vacinadas e machos com idade superior a 8 meses da IN n<sup>o</sup> 41 de 24 de novembro de  
147 2006, do PNCEBT (BRASIL, 2009).

148 A prova de ELISA foi realizada para detecção de *Brucella* spp. lisa, pois kits específicos para  
149 *B. suis* não são produzidos no Brasil e não podem ser importados. Todos os soros foram  
150 submetidos ao ELISA indireto (iELISA) no LDI-UFRB, utilizando a técnica padronizada por  
151 MATURINO (2015), com o mesmo antígeno aplicado para a SAL (amostra lisa), conjugado  
152 anti-igG bovina e *cut-off* de 0,223. Esse ensaio havia demonstrado 33,33% de sensibilidade e  
153 86,66% de especificidade. Foi realizada avaliação estatística descritiva.

154

## 155 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

156

157 No presente estudo, das 889 amostras de soros submetidas ao AAT, 42 apresentaram reações  
158 de aglutinação interpretadas como positivas (4,72%) (Tabela I), num total de 32 propriedades,  
159 distribuídas em 25 municípios. De acordo com SELEEM et al. (2010), o AAT seria o teste  
160 sorológico mais aceitável para identificação de suínos infectados. Nas criações suínas  
161 domésticas o tamanho dos rebanhos é comumente reduzido, apresentando criações mistas  
162 com diversas espécies, especialmente suínos e bovinos. Diante dessa característica e pelo fato  
163 da amostragem estar distribuída pelo estado, era esperada alguma reação sorológica para  
164 presença de *Brucella* spp. nos animais testados. Na Bahia, foi realizada uma pesquisa por  
165 MOTTA et al. (2010) que, utilizando banco de soros da PSC de 2003, encontraram 11,7% dos  
166 criatórios de suínos com pelo menos um animal reativo ao AAT, porém nenhum resultado se  
167 sustentou nos testes confirmatórios. Mesmo que os animais não estejam infectados, baixos

168 títulos de aglutininas podem ser detectados nos testes sorológicos (PORCINE, 2007),  
169 principalmente no AAT, cuja sensibilidade é de aproximadamente 88% (PRAUD et al.,  
170 2012).

171 A realização sequenciada de técnicas para o diagnóstico conclusivo dos indivíduos positivos  
172 em teste de triagem aumenta a especificidade dos procedimentos, pois diminui o número de  
173 falsos-positivos (JARDIM et al., 2009), levando a uma maior confiabilidade do estudo. As 42  
174 amostras que reagiram ao AAT foram submetidas à prova confirmatória do 2-ME/SAL e 01  
175 amostra, oriunda do município de Paripiranga, foi considerada reagente. Para efeito do  
176 PNCEBT, seguindo as regras em relação a bovinos (BRASIL, 2006), a ocorrência real em  
177 relação à brucelose suína no presente estudo foi de 0,11% de animais infectados após exame  
178 confirmatório. Alguns autores também perceberam baixas ocorrências de suínos positivos  
179 após a realização de prova confirmatório por 2-ME, a exemplo de BRAGA et al. (2013), que  
180 encontraram 1,04% (2/192) de anticorpos anti-*Brucella* spp. em suínos provenientes de  
181 criação intensiva no Piauí e, com uma soroprevalência final de 0,65%, AZEVEDO et al.  
182 (2012) concluíram seu estudo no semi-árido da Paraíba. Mesmo com baixos positivos, não se  
183 pode deixar de chamar a atenção para a presença de *Brucella* spp. entre os suínos no Brasil.  
184 Semelhante aos resultados observados no presente estudo, em suínos de criações para  
185 subsistência, FARRO R et al. (2002), utilizando teste confirmatório de fixação do  
186 complemento (FC), indicaram apenas 2,75% de animais positivos para *Brucella* sp. em Lima,  
187 Peru. Conclui-se que a infecção está presente nesses rebanhos, assim como na Bahia,  
188 entretanto em baixos índices. Uma explicação para esse baixo índice foi levantada por SILVA  
189 PAULO et al. (2000), que supõem haver uma ausência de resposta do anticorpo nas primeiras  
190 fases da infecção. Outra hipótese aponta que a infecção geralmente é temporária em leitões,  
191 porém podem mantê-la tornando-se portadores, raramente resultando em sintomas clínicos

192 com baixos títulos de aglutinação e bacteremia transitória (ACHA & SZYFRES, 2001).  
193 MEIRELLES-BARTOLI (2010), verificando anticorpos contra *Brucella* lisas em 1.100  
194 amostras suínas de um frigorífico no estado de São Paulo, observaram que nenhuma resultou  
195 positiva nas provas confirmatórias 2-ME/SAL e FC, do mesmo modo que AGUIAR (2006),  
196 em 104 soros suínos da agricultura familiar do município de Monte Negro-RO, apenas 1  
197 (0,9%) reagiu ao AAT, porém não confirmou no 2-ME/SAL, comprovando a maior  
198 especificidade deste teste. Os achados de não reagentes obtidos no teste confirmatório podem  
199 ser resultado da presença de agentes causadores de reações cruzadas como *Yersinia*  
200 *enterocolitica* (*Ye*) (MOTTA et al., 2010). JUNGENSEN et al. (2006) compartilharam da  
201 mesma conjectura e ressaltaram a importância da contínua investigação para o  
202 desenvolvimento de testes individuais. Contrariamente aos resultados apresentados por este  
203 estudo com os testes AAT e 2-ME/SAL, algumas pesquisas apontam alta soroprevalência de  
204 anticorpos contra *Brucella* lisas em suínos, a exemplo de LEITE et al. (2014), em Mossoró-  
205 RN, que relataram 17,5% na prova confirmatória de FC e ROXO et al. (1996), que  
206 encontraram 88,09% de positivos, por meio do AAT, numa mesma propriedade na região Sul  
207 de São Paulo. São números bastante expressivos, demonstrando o elevado risco sanitário para  
208 as pessoas envolvidas na cadeia produtiva do suíno, incluindo o abate, além de consumidores  
209 e população em geral.

210 Variáveis ligadas à faixa etária, regime de semiconfinamento, introdução de animais  
211 infectados nas criações, alimentação com lavagem, contato com suínos de outros criatórios ou  
212 reservatórios naturais e presença de bovinos, caprinos, ovinos, cães, urubus e ratos podem  
213 estar relacionadas com a alta frequência de reações positivas (LEITE et al., 2014), reunindo  
214 condições para a ocorrência de surtos epidêmicos, bastando um animal infectado para  
215 contaminar o restante do rebanho. Apesar de o presente estudo apresentar apenas um animal

216 reagente no 2-ME/SAL e este teste não ser padronizado para o uso no diagnóstico da  
217 brucelose suína, a elevada sensibilidade e especificidade quando empregado em série com o  
218 AAT, em torno de 95% e 99,5% respectivamente, leva a crer que suínos positivos estejam  
219 realmente infectados (AZEVEDO et al., 2012), representando um risco de possível  
220 transmissão da brucelose para outros animais e para o homem.

221 Todos os soros foram testados no iELISA, detectando 10 animais reagentes (1,12%) em 9  
222 propriedades (2,81%) distribuídas pelos municípios de Candiba, Correntina, Feira de Santana,  
223 Guanambi, Ibipeba, Paratinga e Ribeira do Pombal. Apenas 1 amostra que aglutinou no AAT,  
224 apresentou positividade também ao iELISA, sendo a única propriedade com animais que não  
225 estavam clinicamente saudáveis, mostrando-se com anemia e debilitados. Mesmo realizado com  
226 antígeno anti-IgG bovina (espécie lisa), pode ser muito útil também na detecção de infecção  
227 em suínos, principalmente em fase futura de erradicação da brucelose e na falta de testes  
228 específicos para essa espécie. DI FEBBO et al. (2012) desenvolveram um ensaio de iELISA  
229 para testar anticorpos contra *B. suis* e obtiveram especificidade e sensibilidade de 99,1% e  
230 100,0%, respectivamente com um valor de ponto de corte de 21,7% PP (percentagem de  
231 positividade). A padronização do iELISA, aumentando sua especificidade, poderia viabilizar  
232 seu uso rotineiro como prova confirmatória, inclusive para detecção de *B. suis*. Em seu  
233 estudo, MEIRELLES-BARTOLI et al. (2012) relataram que, em uma propriedade do estado  
234 de São Paulo onde ocorreu confirmação de brucelose suína por isolamento de *B. suis* biovar 1  
235 com altos índices de infecção, bovinos, equinos, ovinos e gansos foram negativos no AAT,  
236 embora se alimentassem de pastos irrigados com dejetos, sem tratamento, oriundo das  
237 matrizes infectadas. Entretanto, três cães que tinham acesso à instalação das matrizes e  
238 contato direto com os fetos suínos abortados foram positivos, além de três funcionários que  
239 trabalhavam diretamente com os animais, sendo que um deles apresentava sinais clínicos.



240 A infecção de um rebanho pela brucelose pode estar associada ao contato com animais  
241 silvestres reservatórios, principalmente javalis e lebres, quando suínos domésticos são criados  
242 livremente (COELHO et al., 2015). Segundo GODFROID et al. (2013), *B. abortus* e *B. suis*  
243 têm sido isoladas a partir de uma variedade de espécies selvagens. A demonstração de que  
244 animais silvestres funcionam como reservatórios da enfermidade serve como mais um alerta  
245 sobre a manutenção de *Brucella* spp. entre as espécies animais. Pesquisas indicam que a  
246 brucelose suína no Brasil tem sido ocasionada por *B. suis*, embora quando criados de forma  
247 promíscua com bovinos pode ser causada por *B. abortus*, não descartando a possibilidade de  
248 transmissão inversa (ROXO et al., 1996; ACHA & SZYFRES, 2001; AGUIAR et al., 2006;  
249 LEITE et al., 2014). Esta afirmativa levanta preocupações com relação ao PNCEBT, uma vez  
250 que suínos infectados com *B. abortus* podem eliminar o agente e expor bovinos ao risco de  
251 infecção, comprometendo o sucesso do programa.

252 Os testes sorológicos são fundamentais e a base do diagnóstico em programas sanitários para  
253 controle ou erradicação da brucelose. No entanto, resultados falso-positivos ou falso-  
254 negativos podem ocorrer. Para minimizar esses efeitos em avaliações com suínos os testes  
255 deveriam ser unificados, mas de acordo com DI FEBO et al. (2012), a limitação na  
256 padronização de exames de diagnóstico sorológico para esta espécie é justificada pela falta de  
257 um soro padrão internacional. Observando a discrepância de resultados entre as diferentes  
258 provas sorológicas utilizadas nos estudos da brucelose suína e a divergência dos testes  
259 recomendados pela legislação brasileira frente à literatura internacional, levaram VICENTE  
260 (2013) a sugerir a necessidade de reavaliação das técnicas para o diagnóstico dessa  
261 enfermidade no país. Devem ser considerados procedimentos formais, como os  
262 implementados pela OIE, para a validação de testes, a exemplo do iELISA, para fins de  
263 controle de *B. suis* em suínos (EFSA, 2009).

264 Dentre os animais sororreagentes a algum dos três exames aplicados, nenhum apresentou  
265 sinais clínicos que levassem a suspeita de brucelose. Observação semelhante foi realizada por  
266 ROSA et al. (2012), que analisaram suínos de alguns municípios do estado de São Paulo no  
267 total de 910 amostras de soros em que todos os animais avaliados apresentavam-se  
268 aparentemente sadios e sem lesões macroscópicas, porém 25 (2,7%) foram positivos ao AAT.  
269 De acordo com MEGID et al. (2010), por apresentar perfil crônico, a brucelose pode  
270 desenvolver diversas formas clínicas ou ser assintomática. ACHA & SZYFRES (2001)  
271 lembraram que a infecção de suínos por *B. abortus* é menos patogênica e geralmente  
272 assintomática. Esta observação é bastante pertinente, principalmente nos estudos que  
273 apresentam suínos sorologicamente positivos, mas sem características clínicas de  
274 enfermidade, criados juntamente com bovinos, pela possibilidade de infecção cruzada entre  
275 essas duas espécies. Opostamente, apenas um criador do município de Valente relatou a  
276 ocorrência de aborto suíno, no entanto não foi observada reação sorológica em qualquer dos  
277 testes empregados. Diferente do encontrado por RIBEIRO et al. (2001), que associaram a  
278 frequência de matrizes sororreagentes às propriedades que apresentam maior índice de  
279 abortos. Observações clínicas, epidemiológicas e de manejo higiênico sanitário são  
280 importantes para o fechamento de um diagnóstico definitivo.

281 Foram totalizadas 40 propriedades em 29 municípios que apresentaram pelo menos um  
282 animal reagente ao AAT ou iELISA (Tabela II), demonstrando que apesar de o presente  
283 estudo evidenciar uma reduzida ocorrência de brucelose suína, a infecção por *Brucella* spp.,  
284 encontra-se distribuída pelo estado da Bahia (Figura 2), representando um risco para os  
285 animais e a saúde humana. Exames específicos para suínos são essenciais em um diagnóstico  
286 mais preciso, com uma legislação voltada para padronização das técnicas empregadas nesta  
287 espécie.

288

289 AGRADecIMENTOS

290 À Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) pela disponibilização do  
291 banco de soros utilizados nesta pesquisa. Laboratório de Defesa Sanitária Animal (LADESA-  
292 ADAB) e Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI-UFRB).

293

294 **REFERÊNCIAS**

295

296 ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2016.**297 Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/publicacoes/relatorios-anuais>.

298 Acesso em: 20 Maio. 2016.

299 ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Brucellosis. In: \_\_\_\_\_ **Zoonoses and communicable diseases**  
300 **common to man and animals: Bacterioses and Mycoses.** 3.ed. Washington, D.C.: PAHO,  
301 2001. p. 28-55.

302 AGUIAR, D.M. et al. Anticorpos contra agentes bacterianos e virais em suínos de agricultura  
303 familiar do município de Monte Negro, RO. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 73, p. 415-  
304 419, 2006.

305 AZEVEDO, S.S. et al. Anticorpos contra brucelas lisas em suínos abatidos no semiárido da  
306 Paraíba. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 97-99, 2012.

307 BARTHASSON, D.L. **Perfil sanitário de suínos de criações extensivas do Estado de**  
308 **Goiás.** 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária da  
309 Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

310 BRAGA, J.F.V. et al. Soroprevalência de pseudorraiva, peste suína clássica e brucelose em  
311 suínos do estado do Piauí. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo

- 312 Horizonte, v. 65, n. 5, p. 1321-1328, 2013.
- 313 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de  
314 24 de novembro de 2006. Aprova os "Critérios Específicos para o Credenciamento e  
315 Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico da Brucelose Bovina e Bubalina". **Diário**  
316 **Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 de novembro de 2006. Seção 1, p. 86,  
317 2006.
- 318 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Legislação:**  
319 **Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009. 440p.
- 320 COELHO, A.C. et al. Risk Factors for *Brucella* spp. in Domestic and Wild Animals. In:  
321 Brucellosis. Intech: Manal Mohammad Baddour. Chap. 1, p. 1-31, 2015. Capturado em 07  
322 abr. 2016. Online. Disponível em:  
323 [https://www.researchgate.net/publication/281210210\\_Risk\\_Factors\\_for\\_Brucella\\_spp\\_in\\_Do](https://www.researchgate.net/publication/281210210_Risk_Factors_for_Brucella_spp_in_Domestic_and_Wild_Animals)  
324 [mestic\\_and\\_Wild\\_Animals](https://www.researchgate.net/publication/281210210_Risk_Factors_for_Brucella_spp_in_Domestic_and_Wild_Animals).
- 325 CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Disease**, v. 3, n. 2, p. 213-  
326 221, 1997.
- 327 DE ZEN, S. et al. **Suinocultura brasileira avança no cenário mundial**. Brasília, DF:  
328 Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2015. 4p. Boletim Ativos da Suinocultura,,  
329 v. 1, n. 1, 2015.
- 330 DI FEBBO, T. et al. Development and evaluation of diagnostic tests for the serological  
331 diagnosis of brucellosis in swine. **Veterinaria Italiana**, v. 48, n. 2, p. 145-156, 2012.
- 332 EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request  
333 from the Commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). **The EFSA Journal**, v. 1144, p.  
334 1-112, 2009.
- 335 FARRO R, D. et al. Frecuencia de *Brucella* sp. en porcinos, procedentes de granjas

- 336 tecnificadas y no tecnificadas, beneficiados en dos mataderos de Lima. **Revista de**  
337 **Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 13, n. 2, p. 72-77, 2002.
- 338 GODFROID J. et al. Brucellosis in terrestrial wildlife. **Revue scientifique et technique**  
339 **(International Office of Epizootics)**, v. 32, n. 1, p. 27-42, 2013.
- 340 IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da**  
341 **Pecuária Municipal**. 2011. Capturado em: 25 mar. 2016. Disponível em:  
342 <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default\\_pdf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm)>.
- 343 IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores:**  
344 **Estatística da Produção Pecuária**. 2016. Capturado em: 25 mar. 2016. Disponível em:  
345 <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/indicadores.php>>.
- 346 JARDIM, G.C. et al. Comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho  
347 bovino vacinado e não vacinado. **Agrarian**, v. 2, n. 5, p. 131-142, 2009.
- 348 JESUS, V.L.T. et al. Brucelose suína no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de**  
349 **Medicina Veterinária**, v. 32, n. 2, p. 101-104, 2010.
- 350 JUNGENSEN, G. et al. Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and  
351 *Yersinia enterocolitica* O:9 after natural or experimental infection in pigs. **Epidemiology &**  
352 **Infection**, v. 134, p. 347–357, 2006.
- 353 LEITE, A.I. et al. Prevalência e fatores de risco para brucelose suína em Mossoró-RN.  
354 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 537-541, junho 2014.
- 355 MATURINO, M.P.M. **Levantamento soroepidemiológico de brucelose em amostras de**  
356 **bovinos abatidos em matadouros inspecionados no Estado da Bahia**. 2015. 89f.  
357 Dissertação (Mestrado em Defesa Agropecuária).Universidade Federal do Recôncavo da  
358 Bahia, Cruz das Almas, 2015.
- 359 MEGID, J. et al. Clinical Manifestations of Brucellosis in Domestic Animals and Humans.

- 360 **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 119-126, 2010.
- 361 MEIRELLES-BARTOLI, R.B. **Avaliação de testes sorológicos no diagnóstico da brucelose**  
362 **suína em amostras provenientes de um frigorífico e de um rebanho naturalmente**  
363 **infectado do estado de São Paulo**. 2010. 141f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária  
364 Preventiva). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2010.
- 365 MEIRELLES-BARTOLI, R.B. et al. Brucellosis due to *Brucella suis* in a swine herd  
366 associated with a human clinical case in the State of São Paulo, Brazil. **Tropical Animal**  
367 **Health and Production**, v. 44, n. 7, p. 1575-1579, 2012.
- 368 MOTTA, P.M.C. et al. Inquérito soropidemiológico para brucelose em suídeos do Brasil.  
369 **Veterinária em Foco**, v. 7, n. 2, p. 141-147, 2010.
- 370 OIE 2009. **Porcine Brucellosis**. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of  
371 the Office International des Epizooties, Paris. Disponível em: <  
372 [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2008/pdf/2.08.05\\_PORCINE](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.08.05_PORCINE)  
373 [\\_BRUC.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.08.05_PORCINE_BRUC.pdf)>. Acesso em: 05 Jun. 2013.
- 374 PAULIN, L.M. Brucelose. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 70, n. 2, p. 239-249, 2003.
- 375 POESTER, F.P. et al. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55-62, 2002.
- 376 PORCINE and Ruminant Brucellosis. Iowa: The Center for Food Security and Public  
377 Health, 2007. Disponível em:  
378 <[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis\\_suis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_suis.pdf)>. Acessado em: 05 Jun.  
379 2013.
- 380 PRAUD, A. et al. Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the  
381 diagnosis of porcine brucellosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 104, p. 94-100, 2012.
- 382 RIBEIRO, T.C.F.S. et al. Inquérito soropidemiológico da brucelose suína em granjas

- 383 comerciais da Zona da Mata de Pernambuco. **Ciência Animal**, v. 11, n. 2, p. 65-71, 2001.
- 384 ROSA, D.C. et al. Soropositividade para brucelose em suínos em abatedouros. **Pesquisa**  
385 **Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 623-626, 2012.
- 386 ROXO E. et al. *Brucella suis* em diversas espécies de animais numa mesma propriedade rural.  
387 **Arq. Inst. Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 11-14, 1996.
- 388 SELEEM, M.N. et al. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v.  
389 140, p. 392–398, 2010.
- 390 SILVA, M.A. et al. Inquérito soropidemiológico da infecção por *Brucella* spp. em granjas  
391 suínolas tecnificadas no Estado de Alagoas. In: VI ENCONTRO INTERNACIONAL DE  
392 PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 6, p. 1-4, 2009. Maringá, Paraná. **Anais...** Centro Universitário  
393 de Maringá – CESUMAR, 2009.
- 394 SILVA PAULO, P. et al. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis  
395 of swine brucellosis in Argentina. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7,  
396 n. 5, p. 828–831, 2000.
- 397 VICENTE, A.F. Pesquisa de *Brucella* spp. em linfonodos de suínos e javalis com linfadenite.  
398 2013. 39f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal, Saúde Pública e Segurança Alimentar).  
399 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo. 2013.
- 400 XAVIER, M.N. et al. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. **Ciência**  
401 **Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2252-2260, 2009.
- 402

403 Tabela I - Resultados obtidos para *Brucella* spp. nos testes AAT, 2-ME/SAL  
404 e iELISA, em suínos no Estado da Bahia

Exame sorológico	N° de animais			N° de propriedades
	Testados	Reagentes	%	
AAT	889	42	4,72	32
2-ME/SAL	42	1	2,38	1
iELISA	889	10	1,12	9

405

406 Tabela II - Municípios e propriedades que apresentaram pelo menos um suíno reagente para *Brucella* spp. aos testes do AAT e iELISA, no Estado da Bahia

	Teste realizado		
	AAT	iELISA	Total
Municípios	25	7	29 <sup>a</sup>
Propriedades	32	9	40 <sup>b</sup>

OBS: <sup>a</sup> três municípios presentes nos dois testes

<sup>b</sup> uma propriedade apresentou animal reagente nos dois testes.

407

408

409

410

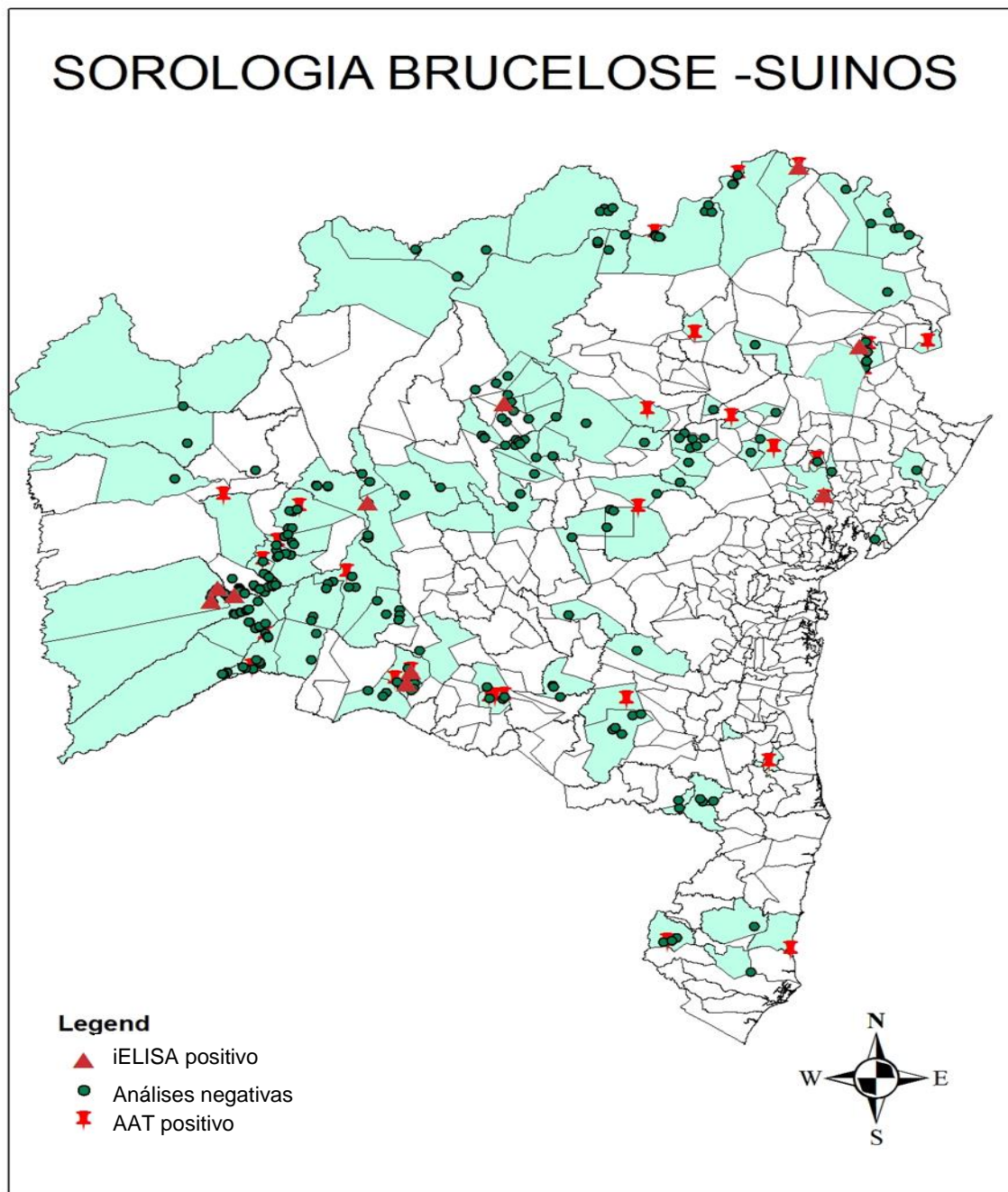
411

412

413



414



415

416 Figura 2: Distribuição geográfica da amostragem e resultados positivos ao AAT e iELISA, no  
417 Estado da Bahia.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Testes no Brasil não são específicos para *B. suis*, pois utilizam antígenos para *B. abortus*, identificando apenas animais infectados por *Brucella* spp. lisas, sujeitos a resultados falso-positivos ou falso-negativos. Torna-se de relevância as informações epidemiológicas e o histórico clínico do rebanho para se formular um diagnóstico definitivo. Seria necessário rever a Legislação no tocante ao diagnóstico da brucelose em suínos, com padronização de técnicas e títulos específicos para leitura dos testes nessa espécie.

De acordo com os resultados, rebanhos com suínos sororreagentes estão distribuídos nos municípios baianos, em diferentes regiões. Estudos epidemiológicos futuros nos suínos domésticos devem ser realizados a fim de estabelecer medidas profiláticas e estratégicas para o controle e/ou erradicação dessa enfermidade.

Na Bahia é comum encontrar pequenas propriedades com criação mista de várias espécies, o que nos leva a refletir que apesar de detectar poucos animais soropositivos, os resultados obtidos no presente trabalho levantam preocupações, pois suínos podem ser reservatórios da *B. abortus*, colocando em risco futuras ações do PNCEBT. Além de representar perigo para a saúde pública, em que suínos da agricultura familiar normalmente são abatidos nas comunidades sem os devidos cuidados.

É necessária intensificação da educação sanitária para conscientização sobre os riscos da brucelose com todos os segmentos envolvidos, manutenção de programas de vigilância ativa e apoio político. Desse modo pode-se conseguir reduzir ainda mais ou erradicar a brucelose dos rebanhos.

## REFERÊNCIAS

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual**.2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/publicacoes/relatorios-aneais>. Acessado em: 20 Mai. 2016.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Brucellosis. In: \_\_\_\_\_ **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Bacterioses and Mycoses**. 3. ed. Washington: PAHO, p. 28-55, 2001.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; DIB, C.C.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, E.M.S.; LARA, M.C.C.S.H.; RODRIGUEZ, C.A.R.; VASCONCOLLOS, S.A.; MORAES, Z.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. Anticorpos contra agentes bacterianos e virais em suínos de agricultura familiar do município de Monte Negro, RO. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, p. 415-419, 2006.

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

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. **Laboratory Techniques in Brucellosis**. Geneva: World Health Organization, Second Edition, n. 55, 1975. 161p.

ARENAS, G.N.; STASKEVICH, A.S.; ABALLAY, A.; MAYORGA, L.S. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4255-4263, 2000.

AZEVEDO, S.S. **Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo**. 2006. 103f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

AZEVEDO, S.S.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, M.L.C.R.; MACEDO, M.M.S.; SANTOS, C.S.A.B.; ALVES, C.J.; HIGINO, S.S.S. Anticorpos contra brucelas lisas em suínos abatidos no semiárido da Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 97-99, jan-mar, 2012.

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

BARLOZZARI, G.; FRANCO, A.; MACRÌ, G.; LORENZETTI, S.; MAGGIORI, F.; DOTTARELLI, S.; MAURELLI, M.; DI GIANNATALE, E.; TITTARELLI, M.; BATTISTI, A.; GAMBERALE, F. First report of *Brucella suis* biovar 2 in a semi free-range pig farm, Italy. **Veterinaria Italiana**, v. 51, n. 2, p. 151-154, 2015.

BARTHASSON, D.L. **Perfil sanitário de suínos de criações extensivas do Estado de Goiás**. 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2005.

BERCOVICH, Z. Maintenance of *Brucella abortus*-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. **Veterinary Quarterly**, v. 20, n. 3, p. 81-88, 1998.

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

BORGES, S.R.T.; SOUZA, L.C.; SILVA, R.C.; ALMEIDA, E. Avaliação dos níveis de biossegurança das granjas de reprodutores suínos certificadas no estado de São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 3, p. 417-431, 2011.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA Nº 19, de 15 de fevereiro de 2002. Aprova as "Normas a serem cumpridas para a Certificação de Granjas de Reprodutores Suídeos". **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de março de 2002. Seção 1, p. 3, 2002.

\_\_\_\_\_. MAPA. Brasília: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): **Manual técnico**. Brasília, 188p., 2006.

\_\_\_\_\_. MAPA. Brasília: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. 2015. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 06 Fev. 2015.

\_\_\_\_\_. MAPA. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Suínos**. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>. Acessado em: 15 Fev. 2016.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, 1994.

BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS-PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1640-1642, 1995.

BRICKER, B.J.; EWALT, D.R.; OLSEN, S.C.; JENSEN, A.E. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 4, p. 374-378, 2003.

BUNDLE, D.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; PERRY, M.B. Characterization of *Brucella* polysaccharide B. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1101-1106, 1988.

CARRINGTON, M.; CHOE, U.; UBILLOS, S.; STANEK, D.; CAMPBELL, M.; WANSBROUGH, L.; LEE, P.; CHURCHWELL, G.; ROSAS, K.; ZAKI, S.R.; DREW, C.; PADDOCK, C.D.; DELEON-CARNES, M.; GUERRA, M.; HOFFMASTER, A.R.; TILLER, R.V.; DE, B.K. Fatal case of Brucellosis misdiagnosed in early stages of *Brucella suis* infection in a 46-year-old patient with marfan syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2173-2175, 2012.

CHERWONOGRODZKY, J.W.; NIELSEN, K.H. *Brucella abortus* 1119-3 O-chain polysaccharide to differentiate sera from *B. abortus* S-19-vaccinated and field-strain-infected cattle by agar gel immunodiffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 1120-1123, 1988.

COLLING, A. **Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America**. In: International Atomic Energy Agency. Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America. Vienna: IAEA - TECDOC 1005, p. 3-14, 1998.

DE CARVALHO, R.F. **Brucelose: frequência, georreferenciamento de focos, fatores de risco em rebanhos bovinos e em seres humanos envolvidos na cadeia produtiva do leite na região do Médio Mearim, Maranhão, Brasil**. 2014. 105f. Dissertação (Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, 2014.

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

DI FEBBO, T.; LUCIANI, M.; PORTANTI, O.; BONFINI, B.; LELLI, R.; TITTARELLI, M. Development and evaluation of diagnostic tests for the serological diagnosis of brucellosis in swine. **Veterinaria Italiana**, v. 48, n. 2, p. 145-156, 2012.

DIAZ-APARICIO, E., ARAGÓN, V., MARÍN, C., ALONSO, B., FONT, M., MORENO, E., PÉREZ-ORTIZ, S., BLASCO, J.M., DÍAZ, R., MORIYON, I. Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep and goats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 3136-3141, 1993.

D'ORNELLAS, M.P.F. **Prova do Antígeno Acidificado Tamponado e Reação em Cadeia da Polimerase no diagnóstico da brucelose bovina em animais abatidos em frigorífico no município de Colíder/MT**. 2014. 44f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, 2014.

EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). **The EFSA Journal**, v. 1144, p. 1-112, 2009.

FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: bases para as intervenções. **Ciência Animal Brasileira**, [S.l.], out. 2009. ISSN 1809-6891. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7669>>. Acesso em: 05 Jun. 2013.

FREITAS, J.A., GALINDO, G.A.R., SANTOS, E.J.C., SARRAF, K.A., OLIVEIRA, J.P. Risco de brucelose zoonótica associado à suínos de abate clandestino. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 101-102, 2001.

GARCIA, L.N.N. **Avaliação sorológica de brucelose e leptospirose em cabras de plantéis leiteiros com histórico de aborto no estado do Rio de Janeiro, no período de julho de 2007 a março de 2008**. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 21 n. 2, p. 277-286, 2002.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVEN, K.S.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J.J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Vet. Res**, v. 36, p. 313–326, 2005.

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

GODFROID, J.; GARIN-BASTUJI, B.; SAEGERMAN, C.; BLASCO, J.M. Brucellosis in terrestrial wildlife. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 32, n. 1, p. 27-42, 2013.

GOPPAUL, K.K.; KOYLASS M.S.; SMITH C.J.; WHATMORE A.M. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 86, p. 1-14, 2008.

- GRÉGOIRE, F.; MOUSSET, B.; HANREZ, D.; MICHAUX, C.; WALRAVENS, K.; LINDEN, A. A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 80, p. 1-8, 2012.
- HÄNSEL, C.; MERTENS, K.; ELSCHNER, M.C.; MELZER F. Novel real-time PCR detection assay for *Brucella suis*. **Veterinary Record Open**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2015.
- JESUS, V.L.T.; PEREIRA, R.C.G.; FLAUSINO, W.; MEIRELES, G.S.; RODRIGUES, J.S.; JORGE, J.L.B.P. Brucelose suína no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n. 2, p. 101-104, abr-jun., 2010.
- JUNGERSEN, G.; SØRENSEN, V.; GIESE, S.B.; STACK, J.A.; RIBER, U. Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* O:9 after natural or experimental infection in pigs. **Epidemiology & Infection**, v. 134, p. 347–357, 2006.
- KALTUNGO, B.Y.; SAIDU, S.N.A.; MUSA, I.W.; BABA, A.Y. Brucellosis: A Neglected Zoonosis. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 12, p. 1551-1574, 2014.
- KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 65-78, 2003.
- LEDWABA, B.; MAFOFO, J.; VAN HEERDEN, H. Genome Sequences of *Brucella abortus* and *Brucella suis* Strains Isolated from Bovine in Zimbabwe. **Genome Announc**, v. 2, n. 5, p. 1-2, 2014.
- LEITE, A. I.; COELHO, W.A.C.; SILVA, G.C.P.; SANTOS, R.F.; MATHIAS, L.A.; DUTRA, I.S. Prevalência e fatores de risco para brucelose suína em Mossoró-RN. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 537-541, jun., 2014.
- LOPES, L.B.; NICOLINO, R.; HADDAD, J.P.A. Brucellosis - Risk Factors and Prevalence: A Review. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 72-84, 2010.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C.M.; DE MIGUEL, M.J.; MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; FERREIRA, A.C.; CARDOSO, R.; CORRÊA DE SÁ, M.I.; WALRAVENS, K.; ALBERT, D.; GARIN-BASTUJI, B. Evaluation of a multiplex PCR assay (bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3484–3487, 2008.
- LORD, V.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; MARCANO, M.J.; MELENDEZ, G. Serological and Bacteriological Study of Swine Brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 295-297, 1997.
- MACKAY, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, [online], v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008940>>. Acesso em: 10 Abr. 2016.

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

MARTINS, M.V.F. **Brucelose em suínos: estudo caso no distrito de Castelo Branco**. 1993. 108f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.11/1047>>. Acesso em: 04 Jun. 2013.

MATHIAS, L.A. Brucelose animal e suas implicações em saúde pública. **Biológico**. São Paulo, v. 70, n. 2, p. 47-48, 2008.

MATHIAS, L.A.; CORBELLINI, L.G.; MAIA, L.; NASCIMENTO, K.F.; PAULIN, L.M.S.; SAMARTINO, L.E.; SERQUEIRA, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; SOUZA, M.M.A. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

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

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

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; AGOTTANI, J.V.B.; MARCOS JR, G. Imunodifusão em gel de ágar com polissacarídeos de membrana de *Brucella abortus* 1119-3 no diagnóstico da brucelose bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 51, n. 5, p. 433-437, 1999.

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

MEIRELLES-BARTOLI, R.B. **Avaliação de testes sorológicos no diagnóstico da brucelose suína em amostras provenientes de um frigorífico e de um rebanho naturalmente infectado do estado de São Paulo**. 2010. 141f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2010.

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

MOL, J.P.S.; FRANÇA, S.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 117-126, 2012.



MORENO, E.; MAYER, H.; MORIYON, I. Characterization of a native polysaccharide hapten from *Brucella melitensis*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p. 2850-2853, 1987.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 209–227, 2002.

MOTTA, P.M.C.; FONSECA JR, A.A.; OLIVEIRA, A.M; NASCIMENTO, K.F.; SOARES FILHO, P.M.; SERRA, C.V.; JESUS, A.L.; RIVETTI JR, A.V.; RAMALHO, A.K.; MOTA, P.M.P.C.; ASSIS, R.A.; CAMARGOS, M.F. Inquérito soropidemiológico para brucelose em suídeos do Brasil. **Veterinária em Foco**, v. 7, n. 2, p. 141-147, 2010.

MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; ENGEL, B.; DE MIGUEL, M.J.; MARÍN, C.M.; DIESTE, L.; MAIAR-JAIME, R. Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 146, n. 2, p. 150-158, 2012.

NARDI JÚNIOR, G.; RIBEIRO, M.G.; MONTEIRO, F.M.; DE JESUS, T.L.; VIEIRA, R.M. Brucelose em touros: uma visão da doença no Brasil com ênfase ao diagnóstico e sua importância ao agronegócio. **Tekhne e Logos**, v. 3, n. 3, p. 1-21, 2012.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 447-459, 2002.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, [online], v. 33, p. 10-13, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016.

OIE, 2009. Porcine Brucellosis. Chapter 2.8.5. **Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres**. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009, Paris. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2008/pdf/2.08.05\\_PO RCINE\\_BRUC.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.08.05_PO RCINE_BRUC.pdf)>. Acesso em: 03 dez. 2015.

OIE, 2012. Biotechnology in the Diagnosis of Ixectuous Diseases. **Terrestrial Manual**. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009, Paris. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

OIE, 2016. **World Organisation for Animal Health**. Disponível em: <<http://www.oie.int/>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

PAULIN, L.M.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXEIRA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arq. Inst. Biol.**, v. 69, n. 4, p. 41-47, 2002.

PAULIN, L.M. Artigo de revisão - Brucelose. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n. 2, p. 239-249, 2003.

PIKULA, J.; BEKLOVA, M.; HOLESOVSKA, Z.; SKOCOVSKA, B.; TREML, F. Ecology of brucellosis of the European hare in the Czech Republic. **Veterinarni Medicina**, v. 50, n. 3, p. 105–109, 2005.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 55-62, 2002.

POESTER, F.P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L.E.; YU, W.L. Diagnosis of brucellosis. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 46-60, 2010.

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

REDDY, T.B.K.; THOMAS, A.D.; STAMATIS, D.; BERTSCH, J.; ISBANDI, M.; JANSSON, J.; MALLAJOSYULA, J.; PAGANI, I.; LOBOS, E.A.; KYRPIDES, N.C. The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta)genome project classification. **Nucleic Acids Research**, p. 1-8, 2014. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/>> Acesso em: 19. abr. 2016.

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

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

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

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

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

SCHURING, G.G.; SIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 479-496, 2002.

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

SILVA, M.A.; SOUZA, L.C.A.; SANTANA, F.C.; VALENÇA, R.M.B.; MOTA, R.A. Inquérito soropidemiológico da infecção por *Brucella* spp. em granjas suínolas tecnificadas no Estado de Alagoas. In: VI ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 6, p. 1-4, 2009. Maringá, Paraná. **Anais...** Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, 2009.

SILVA PAULO, P.; VIGLIOCCO, A.M.; RAMONDINO, R.F.; MARTICORENA, D.; BISSI, E.; BRIONES, G.; GORCHS, C.; GALL, D.; NIELSEN, K. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 5, p. 828-831, 2000.

SOLA, M.C.; FREITAS, F.A.; SENA, E.L.S.; MESQUITA, A.J. Brucelose bovina: revisão. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 686-714, 2014.

ŠPIČIĆ, S.; ZDELAR-TUK, M.; RAČIĆ, I.; VUJNOVIĆ, A.; BENIĆ, M.; DUVNJAK, S.; CVETNIĆ, Ž. Sensitivity of actual laboratory diagnostic methods used for surveillance of swine brucellosis in Croatia. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 11, n. 3, p. 167-173, 2013.

STACK, J.A.; HARRISON, M.; PERRETT, L.L. Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 724–728, 2002.

STRECK, A.F.; GAVA, D.; RECH, H.; CANAL, C.W. Técnicas de diagnóstico imunológico em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 125-130, 2007.

SZULOWSKI, K.; IWANIAK, W.; PILASZEK, J.; TRUSZCZYNSKI, M.; CHROBOCINSKA, M. The ELISA for the examination of hare sera for anti-*Brucella* antibodies. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, p. 33-40, 1999.

VIANA, F.J.C.; FRANKLIN, F.L.A.A.; PEREIRA, C.F.C.; LIMA, D.B.C.; CONDE JUNIOR, A.M.; RIZZO, M.S. Abate clandestino de suínos e pequenos ruminantes na cidade de Teresina, Piauí: implicações na saúde ocupacional. **Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde**, Teresina, v. 1, n. 1, p. 38-47, 2014.

VICENTE, A.F. **Pesquisa de *Brucella* spp. em linfonodos de suínos e javalis com linfadenite**. 2013. 39f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal, Saúde Pública e Segurança Alimentar). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo. 2013.

WATARAI, M.; ITO N.; OMATA Y.; ISHIGURO N. A serological survey of *Brucella* spp. in free-ranging wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) in Shikoku, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 10, p. 1139-1141, 2006.

WHATMORE A.M.; MURPHY T.J.; SHANKSTER S.; YOUNG E.; CUTLER S.J.; MACMILLAN A.P. Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 761-769, 2005.

WHATMORE, A.M.; PERRETT, L.L.; MACMILLAN, A.P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 34, p. 1-15, 2007.

XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Pathological, Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with *Brucella abortus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, p. 149-157, 2009.

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

XAVIER, M.N.; SANT'ANNA, F.M.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; MOUSTACAS, V. S.; MERLO, F.A.; CARVALHO JÚNIOR, C.A.; DASSO, M.G.; MATHIAS, L.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LAGE, A.P., SANTOS, R.L. A comparison of two agar gel immunodiffusion methods and a complement fixation test for serologic diagnosis of *Brucella ovis* infection in experimentally infected rams. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 4, p. 1016-1021, 2011.

ZYGMUNT, M.S.; DUBRAY, G. Preparation by ultrafiltration and control by high-performance liquid chromatography of the native hapten of *Brucella abortus* for use in radial immunodiffusion diagnostic test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 1860-1863, 1987.