

Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil

Equine brucellosis: aspects of the disease in Brazil

Márcio Garcia Ribeiro¹, Rodrigo Garcia Motta, Carlos Augusto Scacchetti de Almeida

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Botucatu, SP, 18618-000, Brasil.

¹Correspondência: mgribeiro@fmvz.unesp.br

Resumo

A brucelose é uma doença infectocontagiosa, com potencial zoonótico, incomum em equinos e é causada predominantemente pela *Brucella abortus*. A doença em equinos não é caracterizada por transtornos reprodutivos como em outras espécies domésticas. Lesões abscedantes em região cervical, bursas, tendões e articulações são as principais manifestações clínicas. A transmissão ocorre pelo consumo de água e de pastos contaminados, principalmente em propriedades endêmicas para a brucelose bovina. Não se recomenda a terapia, e os animais positivos devem ser encaminhados para abate sanitário. O diagnóstico microbiológico é definitivo, e o sorológico é realizado utilizando basicamente as mesmas provas recomendadas para bovinos e búfalos. As descrições da brucelose equina geralmente se apresentam sob a forma de relatos de casos ou estudos soroepidemiológicos regionais. Pouca preocupação tem sido dispensada com os achados epidemiológicos e com a caracterização dos biotipos de *Brucella* spp na doença em equinos. O reconhecimento das características de patogenicidade e dos mecanismos de transmissão podem contribuir nas ações de controle e profilaxia da doença em equinos. O presente estudo revisou os principais aspectos da brucelose equina no Brasil.

Palavras-chave: Brucelose, *Brucella abortus*, equinos, Brasil.

Abstract

Brucellosis is an infectious disease recognized as zoonosis uncommon in equine, caused predominantly by Brucella abortus. The disease in horses is not associated with reproductive problem. Fistulous withers are most common clinical sign of equine brucellosis. The transmission occurs by consumption of contaminated water and grassland, mainly in bovine livestock endemic for brucellosis. No therapy procedures are recommended and sanitary slaughteris recommended for infected animals. Microbiological identification of microorganism is definitive for diagnosis. Serological diagnosis is performed using the same tests for bovine and buffaloes. Equine brucellosis is mainly divulgated in case reports or by regional sero-epidemiological studies. Little attention has been dispended to biotype the agents and to study the epidemiology of the equine brucellosis, considering that it is very important to know the virulence and transmission mechanisms of this microorganism. These studies could contribute to raise control measures of equine brucellosis and also to built successful control and eradication programs against the disease. The aim of present study was to review more important aspects of equine brucellosis in Brazil.

Keywords: Brucellosis, *Brucella abortus*, equine, Brazil.

Introdução

Os equinos representam uma importante espécie entre os animais domésticos em virtude da utilização destes como meio de transporte, tração, entretenimento, esporte, na recuperação de crianças especiais ou mesmo para o consumo humano de produtos e subprodutos cárneos. Estima-se que a população de equinos no Brasil seja da ordem de 10 milhões de animais, concentrados principalmente na região Nordeste do país, seguido das regiões Sul e Sudeste. Diversas enfermidades infecciosas acometem a espécie equina, entre as quais, a brucelose. Nesta espécie, a brucelose é reconhecida como doença infecciosa de evolução crônica, de potencial zoonótico, causada predominantemente pela *Brucella abortus* (*B. abortus*; Acha e Szyfres, 2003).

Nos ruminantes domésticos, em suínos e em cães, a brucelose é considerada doença da esfera reprodutiva (Corrêa e Correa, 1992). Entretanto, na espécie equina, os prejuízos econômicos decorrentes da brucelose são considerados inferiores quando comparados às outras espécies de interesse zootécnico, visto que são raros os transtornos reprodutivos em equinos (Ribeiro *et al.*, 2003). Os programas de controle e erradicação da brucelose em ruminantes domésticos têm obtido êxito em vários países, reduzindo, significativamente, a prevalência da enfermidade (Santellano *et al.*, 2004). Porém, a presença dos reservatórios silvestres, a co-habitação de espécies animais, a resistência do microrganismo em condições adversas no ambiente (Poester *et al.*, 2002) e a ausência de protocolos efetivos no tratamento da doença em animais são fatores que favorecem a manutenção do microrganismo no ambiente e em criatórios de animais domésticos, inviabilizando, por vezes, sua erradicação em determinadas regiões ou países (Castro *et al.*, 2005).

A Organização Internacional de Epizootias (OIE) classifica a brucelose como doença da Lista B, na qual estão incluídas enfermidades que possuem significativo impacto sócioeconômico e/ou para saúde pública, e que determinam graves conseqüências no comércio de animais e seus produtos (Office Internacional des Epizooties - OIE, 2002). A grande maioria dos estudos soropidemiológicos para brucelose têm sido realizados em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e cães, com destaque para os ruminantes (Gonzalez *et al.*, 2006). Em contraste, pouca ênfase tem sido dada à epidemiologia da brucelose em eqüinos, tendo em vista que grande parte das descrições, disponíveis na literatura, restringem-se às notificações de casos clínicos (Robertson *et al.*, 1973; Carrigan *et al.*, 1987).

Em 2001, foi deflagrado o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) bovina e bubalina, regulamentando as metodologias diagnósticas, estratégias de controle e profilaxia, entre outros procedimentos (Brasil, 2006). No entanto, o PNCEBT não dispõe de normas detalhadas para a brucelose eqüina, o que dificulta, sobremaneira, as ações de controle e profilaxia da doença nesta espécie. Ademais, a ausência de padronização e interpretação dos métodos sorodiagnostics na brucelose eqüina gera dificuldades quanto à conduta sanitária na doença. O presente estudo tem como objetivo revisar os principais aspectos da brucelose eqüina, com ênfase na epidemiologia, principais manifestações clínicas, métodos diagnósticos, ações de controle e profilaxia, e implicações em saúde pública.

Etiologia e propriedades gerais

A brucelose é causada por bactérias pertencentes ao gênero *Brucella*, que se apresentam microbiologicamente como cocobacilos Gram-negativos, aeróbios ou microaerófilos, não capsulados, imóveis, não formadores de esporos, desprovidos de plasmídeos (Nielsen *et al.*, 2004). Possuem metabolismo oxidativo baseado na utilização de nitratos. Nos testes bioquímicos, são classificadas como catalase e oxidase-positivos e não fermentadores de lactose (Paulin, 2003). São reconhecidos como microrganismos intracelulares facultativos, estando a patogenia e a natureza da resposta imune fortemente relacionadas à presença do microrganismo no interior de fagócitos (Gonzalez *et al.*, 2006). A *B. abortus* é isolada em três a cinco dias no ágar-*Brucella* ou no meio convencional de ágar enriquecido com sangue ovino, bovino ou eqüino a 5% (desfibrinado), em condições de microaerofilia a 37°C. A partir de três dias de incubação, as colônias apresentam 2 a 3 mm de diâmetro, são opacas, lisas, não hemolíticas (Nielsen, 1990). Bioquimicamente, *B. abortus* é urease-positivo (reação em poucos minutos) e indol-negativo (Quinn *et al.*, 1994). Na vigência de cultura microbiana de materiais suspeitos, sujeitos à contaminação bacteriana secundária, podem ser utilizados meios seletivos como o meio de Farrel, constituído de vários antimicrobianos impeditivos para outros microrganismos (Nielsen e Duncan, 1990).

Classicamente, as brucelas podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos, denominadas lisas (*B. abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis*) e rugosas (*Brucella ovis* e *Brucella suis*) (Metcalf *et al.* 1994), com base nas características de multiplicação em meios de cultura no primo-isolamento e na estrutura da parede bacteriana (Nielsen *et al.* 2001). Assume-se que as espécies de *Brucella* possuem vários biotipos (biovars), que demonstram diferenças quanto à predileção de espécies e/ou órgãos-alvo (Nielsen, 1990). A classificação dos diferentes biotipos é fundamentada no requerimento de CO₂, na produção de H₂S, na multiplicação na presença de tionina e fucsina básica, na aglutinação com anti-soros mono-específicos (A, M, R) e na lise por bacteriófagos (Nielsen e Duncan, 1990; Quinn *et al.*, 1994).

Considera-se que *B. abortus* possua sete biotipos, embora maior número tenham sido descrito até o momento, mas não reconhecidos na rotina de caracterização atual da espécie. Assume-se também que *Brucella suis* (*B. suis*) possua cinco biotipos e *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) três, enquanto *Brucella ovis* (*B. ovis*), *Brucella canis* (*B. canis*) e *Brucella neotomae* (*B. neotomae*) não apresentariam biovariantes (Quinn *et al.*, 1994). Nielsen e Duncan (1990) postularam que todas as espécies de *Brucella* reconhecidas atualmente teriam derivado de *B. abortus* biotipo 2. Estudo realizado em 37 países visando ao isolamento de *B. abortus* das principais espécies domésticas constatou que, das 266 linhagens isoladas, 241 (90,6%) foram provenientes de vacas pertencentes predominantemente aos biotipos 1, 2 e 3, reforçando a espécie bovina como principal reservatório de *B. abortus* (Nielsen e Duncan, 1990).

No Brasil, Megid *et al.* (2005) investigaram recentemente a caracterização de biotipos em quatro fetos bovinos e um bubalino. Os autores identificaram biotipo 1 (um feto bovino e um feto bubalino), biotipo 2 (um feto bovino) e biotipo 3 (um feto bovino), ressaltando para a primeira caracterização de biotipo em linhagem de *B. abortus* isolada de feto bubalino no país e para a predominância dos biotipos 1, 2 e 3 nos abortamentos nestas espécies animais. Em contraste, pouca atenção tem sido dispensada na caracterização de biotipos isolados de eqüinos. Ekers (1987) relatou maior prevalência do biotipo 1 de *B. abortus* em eqüinos na Austrália. Robertson *et al.* (1973) reportaram ocorrência rara de abortamento em égua por *B. abortus* biotipo 1, enquanto Cook e Kingston (1988) descreveram caso incomum da doença em eqüinos, causada por *B. abortus* biotipo 1. No entanto, a maioria das descrições dos biotipos em eqüinos limita-se a relatos de casos, o que dificulta esclarecer o impacto dos diferentes biovars na virulência e na cadeia epidemiológica da brucelose nos eqüinos.

Os microrganismos do gênero *Brucella* resistem à inativação em condições adversas do ambiente (Gonzalez *et al.* 2006), incluindo extremos de pH, temperatura e luminosidade (Nielsen, 1995). Podem resistir

por seis meses ou mais na água, nos fetos abortados, em restos de placenta, nas fezes, na lã, no feno ou no solo (Lucero *et al.*, 2008). No leite e derivados, mantêm-se viáveis por vários meses (Omer *et al.*, 2000). O microrganismo é destruído pela fervura e temperaturas usuais de pasteurização (Paulin, 2003). Desinfetantes clorados (2,5% de cloro ativo), soluções de formaldeído (2%) e compostos fenólicos (2,5%) inativam o microrganismo a partir de 15 minutos de exposição (Castro *et al.*, 2005). Álcool 70% destrói prontamente a bactéria (Paulin, 2003). Já sob ação do carbonato de cálcio (1:10) é destruída após 30 minutos de exposição (Omer *et al.*, 2000).

Brucelose nos eqüinos

Epidemiologia

A brucelose figura entre as enfermidades infecciosas mais difundidas em todo o mundo (Viana *et al.*, 1981; Paulin, 2003). A doença possui ocorrência elevada especialmente na bacia do Mediterrâneo, Península Arábica, Índia, México, América Central e do Sul (Vasconcellos *et al.*, 1987; Acha e Szyfres, 2003). Determinados países obtiveram êxito na erradicação da enfermidade, incluindo Noruega, Finlândia, Suécia e Dinamarca (Vasconcellos *et al.*, 1987). Estima-se que no Brasil a ocorrência da brucelose bovina seja em torno de 4 a 5% do rebanho (Poester *et al.*, 2002).

A brucelose eqüina merece preocupação em virtude da debilidade orgânica que provoca nos animais, pelos prejuízos decorrentes da eutanásia dos eqüinos infectados, além de constituírem fonte de infecção para outras espécies domésticas e, inclusive, para o homem (Ribeiro *et al.*, 2003; Radostits *et al.*, 2007). Ainda que o mecanismo de transmissão da brucelose eqüina não esteja bem esclarecido, considera-se que a infecção seja resultante da coabitação dos eqüinos com outras espécies domésticas, em especial bovinos, bubalinos e suínos, visto que os eqüinos compartilham da infecção preferencialmente por *B. abortus* (Acha e Szyfres, 2003) e, secundariamente, por *B. suis* (Cook e Kingston, 1988; Acha e Szyfres, 2003).

Não há espécie-especificidade do microrganismo quanto aos hospedeiros que infectam, mas existe certa seletividade por determinadas espécies animais (Paulin *et al.*, 2002). Assim, *B. abortus* acomete principalmente bovinos, bubalinos e eqüinos; *B. suis*, os suínos; *B. melitensis*, os caprinos (exótica no Brasil); *B. ovis*, os ovinos; *B. canis*, os canídeos e *B. neotomae*, roedores do deserto norte americano (Nielsen *et al.*, 2001). Recentemente, foi diagnosticado *Brucella* spp. em animais marinhos (focas, golfinhos) que, provisoriamente, receberam a denominação de *B. maris* (Castro *et al.*, 2005).

Acredita-se que a transmissão para os eqüinos ocorra pela ingestão de água e alimentos contaminados pelo microrganismo proveniente de descargas vaginais, lóquios de abortos e restos placentários de fêmeas infectadas (Langenegger e Szechy, 1961; Castro *et al.*, 2005).

Brucella spp pode permanecer viável por vários meses em fetos, pastos e água contaminada, favorecendo a manutenção do patógeno no ambiente e a endemicidade nos plantéis (Cohen *et al.*; 1992, Paulin, 2003; Rosa *et al.*, 2006). Releva-se notar que os estudos direcionados à brucelose eqüina usualmente são descritos sob a forma de relatos de caso ou estudos soroepidemiológicos regionais. A restrita literatura sobre a doença na espécie dificulta o esclarecimento da prevalência, dos mecanismos de transmissão, da predominância dos biotipos e suas inter-relações com a virulência na brucelose eqüina, bem como a relevância da co-habitação de espécies na ocorrência da doença, que permitiriam esclarecer a epidemiologia e o real impacto da enfermidade na espécie (Cohen *et al.*, 1992; Ribeiro *et al.*, 2003; Lucero *et al.*, 2008).

Cohen *et al.* (1992) descreveram que nove eqüinos com bursite de cernelha soropositivos para brucelose mostraram significância estatística para o pastoreio consorciado com a espécie bovina, o que reforça a prática de co-habitação de espécies domésticas como fator de risco na brucelose eqüina. A soroprevalência da doença em 393 eqüinos do Iraque constatou 16,28% de animais reagentes (Ali *et al.*, 1985). Castro *et al.* (2005), na Argentina, revelaram 2,8% de ocorrência de brucelose em eqüinos com predomínio nas fêmeas com mais de 10 anos de idade. Na América Latina, Lucero *et al.* (2008) investigaram a brucelose em 320 eqüinos que possuíam histórico de co-habitação com bovinos e observaram 5,63% de ocorrência da doença.

No Brasil, Oliveira *et al.* (1973) encontraram 5,3% de reagentes em 75 eqüinos em Santa Maria, RS, utilizando as provas de soroaglutinação rápida em placa e lenta em tubos. Langoni e Silva (1997) detectaram 1,77% de animais reagentes na soroaglutinação rápida e 0,82% na prova lenta em tubos em 734 eqüinos procedentes do Estado de São Paulo. No Pará, estudo soroepidemiológico conduzido em diversas espécies domésticas revelou prevalência de 17,85% da brucelose em eqüinos. No mesmo estudo, os autores ressaltaram para a prevalência de 19,14% em bovinos, que pouco diferiu dos eqüinos, manifestando a provável co-habitação interespecies na disseminação da doença (Lopes *et al.*, 1999). Recentemente, Almeida *et al.* (2007) avaliaram 875 amostras de soro de eqüinos abatidos nas regiões Sul e Sudeste utilizando a prova do antígeno acidificado tamponado e observaram 15 (2%) animais reagentes.

Patogenia

A infecção por *Brucella* spp nos animais domésticos pode ocorrer pela via oral, mucosas, conjuntivas, venérea e, ocasionalmente, pela formação de aerossóis e via transcutânea (Nielsen e Duncan, 1990). Nos eqüinos, *B. abortus* ingressa nos animais susceptíveis predominantemente por via oral (Radostitis *et al.* 2007). Atingem inicialmente a mucosa oro-nasal e linfonodos regionais onde se multiplicam e permanecem por semanas a meses (Paulin, 2003). Após a multiplicação inicial, ganham a corrente sangüínea preferencialmente no interior dos fagócitos (macrófagos) ou livres no plasma (Acha e Szyfres, 2003), estabelecendo bacteremia por volta de uma a duas semanas (Santellano-Estrada *et al.*, 2004). Em seguida, via linfo-hematógena, difundem-se para todo o organismo animal, localizando-se principalmente no sistema mononuclear fagocitário, como baço, fígado e linfonodos, induzindo à formação de granulomas difusos e hiperplasia linfóide (Paulin, 2003). A viabilidade de *Brucella* spp no interior das células fagocitárias é creditada à inibição da fusão dos lisossomos com os grânulos secundários, impedindo a formação dos fagolisossomos (Poester *et al.*, 2002). No entanto, a resistência à lise intracelular é dependente da espécie de *Brucella* spp e, também, da espécie animal (Carter e Chengappa, 1991). Apesar da indução de resposta imune tanto celular como humoral, a imunidade dos susceptíveis ao gênero *Brucella* é predominantemente de origem celular (Nielsen *et al.*, 2004).

Nos ruminantes domésticos e suínos, após a bacteremia, o microrganismo apresenta tropismo pela placenta (Metcalf *et al.*, 1994) e, posteriormente, pelo feto, levando à necrose da junção carúncula-cotilédone (Nielsen, 1990) e/ou infecção fetal. A invasão fetal resulta usualmente em líquido sero-sangüinolento em cavidades, pneumonia, hepato-esplenomegalia e sofrimento fetal (má nutrição e oxigenação), que geralmente culminam com a expulsão do produto no terço final da gestação (Paulin, 2003, Castro *et al.*, 2005). Nestas espécies, a predileção do gênero *Brucella* é atribuída, em parte, à presença de compostos que favoreçam o metabolismo bacteriano (Poester *et al.*, 2002), como o eritritol (álcool polihídrico), presente no útero gravídico, glândula mamária, tecidos ósteo-articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (Carter *et al.*, 1991).

Eqüinos, seres humanos, coelhos, ratos e outros roedores possuem ausência ou baixa produção do eritritol, o que justificaria, em tese, o reduzido impacto da brucelose como doença da esfera reprodutiva nestas espécies. Com efeito, nos eqüinos, o microrganismo tem predileção por bursas, tendões, ligamentos, sinóvia e articulações, acarretando severa inflamação nestes locais (Nielsen e Duncan, 1990). MacMillan *et al.* (1990) investigaram os efeitos da infecção experimental por *B. abortus* em cinco éguas e um garanhão. Os autores submetteram o colostro, sangue de potros -antes e depois da amamentação-, e fragmentos de placenta à cultura microbiológica e não obtiveram êxito no isolamento do microrganismo, concluindo não haver evidências da transmissão vertical na espécie eqüina.

Clínica

A brucelose eqüina é classicamente uma doença de evolução crônica que, embora seja mais prevalente e grave na espécie bovina, pode acometer seriamente os eqüinos (Thomassian, 2005).

Os prejuízos advindos com a infecção nos criatórios de eqüinos são menores se comparados às outras espécies de interesse zootécnico, visto que nos eqüinos são incomuns os transtornos da esfera reprodutiva (Robertson *et al.*, 1973). No entanto, a doença nos eqüinos merece preocupação em face não só das lesões debilitantes que limitam ou inviabilizam o uso dos animais, com indicação de eutanásia dos animais acometidos, como também do conseqüente prejuízo para o plantel e do potencial de contágio do microrganismo para os eqüinos, outras espécies domésticas e para o homem (Ribeiro *et al.*, 2003).

Na espécie eqüina, as lesões mais sugestivas da doença são representadas por inflamações, de caráter purulento em bursas, ligamentos, tendões, sinóvias e articulações, preferencialmente na região da cernelha (local de junção das duas escápulas; Fig. 1) ou na espinha da escápula (bursite supra-espinhosa), com presença ou não de fístulas (Vasconcellos *et al.*, 1987; Paulin, 2003), popularmente denominadas “Mal da Cernelha”, “Mal da Cruz”, “Bursite Cervical” ou “Abscesso de Cernelha” (Ribeiro *et al.*, 2003). O período de incubação é variável, perdurando de uma semana até quatro meses. A fase inicial de bacteremia é extremamente fugaz na primo-infecção, e os animais tornam-se assintomáticos por meses, manifestando tardiamente os processos lesionais (Riet-Corrêa *et al.*, 2003, Thomassian, 2005).

A infecção por *B. abortus* e, ocasionalmente, por *B. suis* em eqüinos provoca intensa inflamação na região escapular, atlantal ou nucal. À palpação, a área lesional mostra-se distendida, endurecida, hiperêmica e com pontos de flutuação, que tendem à abscedação de material purulento (Castro *et al.*, 2005; Thomassian, 2005). O conteúdo é composto predominantemente por líquido branco-amarelado, viscoso, seroso a seropurulento, o qual contém milhares de bactérias viáveis (Paulin, 2003). Ocasionalmente, o processo lesional pode evoluir para tecidos conjuntivos mais profundos da região interescapular, atingindo as apófises espinhosas das primeiras vértebras cervicais e torácicas (Thomassian, 2005). Raramente são observados quadros de infecção generalizada nos animais, os quais se manifestam por febre intermitente, rigidez, letargia, inapetência e dificuldade de locomoção, geralmente secundário ao desenvolvimento de bursite cervical (Riet-Corrêa *et al.*, 2003). Nos casos

crônicos, articulações e tendões podem estar comprometidos, incluindo os ligamentos vertebrais dorsais (Cohen *et al.*, 1992).

São raras as descrições de abortamentos na espécie eqüina atribuídos à infecção pelo gênero *Brucella* (Castro *et al.*, 2005). Em virtude disso os eqüinos usualmente são considerados hospedeiros “acidentais” de *B. abortus*, de importância relativa na cadeia epidemiológica de transmissão intra ou entre-plantéis de eqüinos e para outras espécies. No entanto, na presença de fístula de cernelha, o conteúdo do exsudato é altamente rico em brucelas viáveis, e isso deve ser levado em consideração como fator de contaminação ambiental para outras espécies domésticas, assim como para a infecção humana (Ribeiro *et al.*, 2003).



Figura 1. Abscesso em região de cernelha em eqüino causado por *Brucella abortus*. Botucatu, SP, 2005.

Diagnóstico

O diagnóstico de rotina da brucelose eqüina é fundamentado nos achados clínico-epidemiológicos, apoiado nos exames laboratoriais subsidiários (Castro *et al.*, 2005). Na anamnese, faz-se necessário questionar a procedência do animal, com o intuito de reconhecer se provém de áreas endêmicas para brucelose, bem como se co-habita com outras espécies domésticas, especialmente bovinos, bubalinos e suínos. Soma-se a esta conduta o exame clínico rigoroso, com especial interesse na presença de aumento de volume e/ou fístulas em região de cernelha (Smith, 1994). Dentre os achados clínico-laboratoriais, os eqüinos com brucelose revelam geralmente leucocitose por neutrofilia e, ocasionalmente, monocitose.

A brucelose eqüina pode ser diagnosticada por métodos diretos ou indiretos (Nielsen *et al.*, 1998). Diferentes procedimentos têm sido utilizados na detecção da brucelose em eqüinos. O diagnóstico inequívoco é firmado a partir do isolamento da bactéria procedente das lesões cervicais (Ribeiro *et al.*, 2003). O exame bacteriológico é realizado a partir de material oriundo do conteúdo de abscessos de cernelha, ligamentos, articulações e, excepcionalmente, casos de abortamentos (Langenegger e Szechy, 1961; Ribeiro *et al.*, 2003).

B. abortus pode ser isolada em meios convencionais como o ágar-sangue ovino (5%) desfibrinado, em condições microaerofilia, a 37° C, entre três a cinco dias (Carter e Chengappa, 1991; Ribeiro *et al.*, 2003). Para materiais com suspeita de contaminação por microrganismos oportunistas, recomenda-se o meio de Farrel que contém vários antimicrobianos (ácido nalidíxico, bacitracina, ciclohexamida, nistatina, polimixina B e vancomicina) que minimizam a contaminação bacteriana secundária (Quinn *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1998). No ágar sangue ovino as colônias são pequenas, translúcidas, opacas, convexas, com bordos arredondados, após quatro a cinco dias de incubação. À microscopia, *Brucella* spp apresenta-se como cocobacilo Gram-negativo pela coloração clássica de Gram (Castro *et al.*, 2005). Entretanto, outros métodos tintoriais podem ser utilizados no diagnóstico incluindo o Ziehl-Neelsen modificado e Köster (Carter e Chengappa *et al.*, 1991, Quinn *et al.*, 1994).

O diagnóstico microbiológico diferencial nos casos de abscessos em região de cernelha e sinovites em eqüinos deve ser procedido para *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e para os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Corrêa e Corrêa, 1992; Smith, 1994; Reed *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003). Alternativamente, na presença exclusiva de abscesso em região de cernelha, deve ser aventado no plano diagnóstico o diferencial para o parasita *Oncocerca cervicalis* (Radostits *et al.*, 2007). Em anos recentes, o diagnóstico direto também tem sido realizado utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), que identifica, com alta sensibilidade e especificidade, pequenas seqüências do DNA bacteriano de *Brucella* spp nas amostras analisadas (Nielsen *et al.*, 1998, 2004). Entretanto, a dificuldade de isolamento de *Brucella* spp em

determinadas lesões, a contaminação por microrganismos oportunistas (Cohen *et al.*, 1992) e o uso empírico de antimicrobianos na terapia de animais infectados são fatores que podem limitar o diagnóstico direto da brucelose equina ou mesmo contribuir para o subdiagnóstico na espécie (Ribeiro *et al.*, 2003; Radostitis *et al.*, 2007).

Frente às dificuldades do diagnóstico microbiológico, o diagnóstico sorológico tem sido recomendado (Acha e Szyfres, 2003). Os testes sorológicos no diagnóstico da brucelose animal apresentam, como peculiaridades, simplicidade de execução, de interpretação, custo acessível, uso massal, boa sensibilidade e especificidade (Nielsen, 1995). Apesar da disponibilidade de vários testes sorológicos, diferentes autores têm alertado para a ocorrência de reações inespecíficas e para a falta de padronização na interpretação dos métodos de sorodiagnóstico da doença em equinos (Langenegger e Szechy, 1961; Ribeiro *et al.*, 2003).

A pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* em animais domésticos pode utilizar, como material sorológico, plasma, sêmen e leite (Nielsen e Duncan, 1990). Os testes empregados no diagnóstico da brucelose foram desenvolvidos com base na dinâmica de formação de anticorpos, em resposta ao estímulo antigênico (Alton *et al.*, 1975). A produção de imunoglobulinas (IG) em animais de produção, após infecção por brucelas patogênicas, caracteriza-se pelo aparecimento de quatro isotipos: IgM, IgG1, IgG2, IgA (Nielsen, 2004). As Ig são dirigidas em sua grande maioria contra o lipopolissacarídeo (LPS) de membrana de *Brucella* spp, mais especificamente a fração polissacarídica (POLI O). A resposta de IgM aparece poucos dias após a exposição, aumentando rapidamente, atingindo valor máximo ao redor da segunda semana. Em seguida, declina permanecendo em níveis detectáveis (Nielsen *et al.*, 2001). O isotipo IgG1 segue padrão semelhante, com picos mais tardios que IgM (4 a seis semanas), tendendo a permanecer detectável por longos períodos (Nielsen *et al.*, 2004). A classe IgG é a mais importante do ponto de vista diagnóstico em virtude de sua especificidade de ligação com os epítomos do gênero *Brucella* (Macmillan *et al.*, 1990).

Os isotipos IgG2 e IgA aparecem em torno de duas semanas pós-infecção, aumentam gradualmente, mas permanecem em níveis baixos (Carter e Chengappa, 1991). Ao contrário, fêmeas bovinas e bubalinas, vacinadas entre três e oito meses de idade com a cepa atenuada B 19, apresentam resposta de produção de Ig muito similar à dos animais infectados. Porém, tendem a manter predominantemente níveis persistentes de IgM até 24 meses de idade, o que permite diferenciar, após este período, as reações vacinais das de infecção natural, cujas últimas caracterizam-se pela persistência da classe IgG (Macmillan *et al.*, 1990; Nielsen *et al.*, 2004). A classe IgM possui grande capacidade aglutinante nas provas de soroaglutinação e também fixação de complemento (Paulin *et al.*, 2002). Predominam na resposta humoral pós-vacinal e em infecções agudas para a maioria dos antígenos bacterianos. Entretanto, determinam reações cruzadas e indesejáveis com outras bactérias Gram-negativas que possuem constituição de parede bacteriana similar ao gênero *Brucella* (Nielsen *et al.*, 1998), incluindo *Yersinia enterocolitica* (09), *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* (Macmillan *et al.*, 1990). Com efeito, a maioria das modificações introduzidas nos testes diagnósticos de brucelose visa reduzir a atividade destes anticorpos e detectar, preferencialmente, a classe IgG (Nielsen *et al.*, 2004).

No Brasil, são escassos os estudos sobre a brucelose equina, o que limita delinear claramente a situação da enfermidade no país (Langenegger e Szechy, 1961; Godoy e Barg, 1976; Viana *et al.*, 1981; Langoni e Silva, 1997; Rosa *et al.*, 2006). Nas últimas décadas, os inquéritos sorológicos direcionados ao diagnóstico da brucelose equina no Brasil têm utilizado as provas de soroaglutinação rápida em placa, lenta em tubos e 2 – mercaptoetanol (Ribeiro *et al.*, 2003).

Em 2001, foi implantado o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que é coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil – MAPA, com o intuito de diminuir a prevalência e o impacto negativo da brucelose animal no país, com vistas a assegurar a competitividade da pecuária nacional, assim como diminuir o risco dessa grave zoonose. O PNCEBT introduziu em todo o território nacional a imunização obrigatória de bezerras e búfalas entre três e oito meses de idade, utilizando a vacina atenuada B19, e também definiu estratégias de certificação de propriedades livres e monitoradas. Ademais, instituiu a obrigatoriedade da habilitação dos médicos veterinários para o diagnóstico dessa doença em cursos ministrados por professores e pesquisadores de Instituições de Ensino e Pesquisa credenciadas, bem como definiu os métodos de diagnóstico e destino sanitário de animais positivos, entre outros procedimentos. Os testes sorológicos indicados no diagnóstico da brucelose bovina e bubalina no PNCEBT são classificados em testes de rotina (triagem), vigilância epidemiológica e confirmatórios. De acordo com o programa, o diagnóstico indireto da brucelose bovina e bubalina é feito pelas técnicas do antígeno acidificado tamponado corado pelo Rosa Bengala (ATA), 2 – mercaptoetanol (2-ME), fixação de complemento e teste do anel em leite ou “Ring Test” (Brasil, 2006).

O teste do ATA possui o antígeno de *B. abortus* acidificado a pH 3,65, que limita a aglutinação com imunoglobulinas (Ig) da classe IgM, priorizando reações com a classe IgG, que é considerada a Ig específica de doença (Nielsen *et al.*, 1998). A prova do ATA é considerada de rotina (triagem) e substituiu o teste de soroaglutinação rápida que, apesar da boa sensibilidade, apresentava dificuldades de interpretação em virtude das várias diluições do soro (Nielsen *et al.*, 2004). No ATA são utilizados 30 µl do soro e 30 µl do antígeno e, após 4 minutos, os animais que apresentarem reação de aglutinação são considerados positivos (Nielsen *et al.*, 1998). A critério do médico veterinário, os animais positivos nesta prova podem ser conduzidos ao abate sanitário em abatedouros inspecionados ou terem seu “status” positivo confirmado nas provas de 2-ME ou FC

(confirmatórias; Brasil, 2006). O 2-ME é realizado em tubos com várias diluições (1:25, 1:50, 1:100, 1:200) com leitura em 48 horas, confrontando os resultados com a prova de soroaglutinação em tubos, com vistas a dirimir eventuais reações inespecíficas de origem vacinal, geralmente ocasionadas por IgM (Nielsen *et al.*, 2004). Entretanto, qualquer que seja a reação de aglutinação (completa) nas diferentes diluições no teste de 2-ME, o animal é qualificado como positivo e, à semelhança dos reagentes no ATA, deve ser destinado ao abate sanitário (Brasil, 2006).

A Fixação de Complemento é uma técnica altamente específica que identifica anticorpos fixadores de complemento das classes IgM e IgG, amplamente utilizada em vários países para o diagnóstico e para o trânsito internacional de animais em importação e exportação (Brasil, 2006). No entanto, é extremamente laboriosa e necessita de padronização entre os laboratórios, em virtude de pequenas variações do método (Nielsen *et al.*, 2004). Desta forma, no PNCEBT foi reservada para o diagnóstico de animais destinados ao trânsito internacional ou como confirmatória ao ATA, e tem sido realizada somente em laboratórios oficiais do MAPA ou credenciados em certas Instituições de Ensino e Pesquisa do país (Brasil, 2006). O “Ring Test” identifica IgM, IgG e IgA no leite provenientes do latão ou tanque, em rebanhos com vacas infectadas, não possuindo, portanto, aplicação prática no diagnóstico da brucelose eqüina.

Em que pese o impacto positivo na pecuária nacional do PNCEBT e o rigor adotado para a brucelose em bovinos e bubalinos desde a deflagração do programa, a normativa não apresenta detalhamento sobre os métodos diagnósticos na brucelose para outros animais de produção (eqüinos, suínos, caprinos, ovinos). Epidemiologicamente, estas espécies poderiam atuar como fontes de infecção e reservatórios para o gênero *Brucella* para infecções interespecies, dificultando, em parte, o próprio sucesso do PNCEBT e o estabelecimento de conduta sanitária específica nas demais espécies de interesse zootécnico.

Dawson e Durrant (1975) assinalaram alta sensibilidade nas provas de fixação de complemento e antiglobulina de Coombs, em contraste com a baixa sensibilidade do ATA no diagnóstico da brucelose eqüina. Os autores salientaram também a falta de padronização dos testes sorológicos no diagnóstico da brucelose eqüina.

Macmillan e Cockren (1986) avaliaram a resposta humoral na infecção experimental por *B. abortus* em eqüinos utilizando diferentes métodos sorológicos. Os autores observaram que, nas provas de soroaglutinação rápida, ATA e fixação de complemento, os títulos declinaram a partir de um mês, desaparecendo ao redor de 18 meses pós-infecção. Em contraste, os títulos para 2-ME atingiram pico semelhante, embora tenham negativado mais precocemente entre seis e oito meses.

Ribeiro *et al.* (2003) centrifugaram o conteúdo de secreção da bursite cervical em eqüinos com sintomas clínicos de brucelose, e utilizaram o sobrenadante - ao invés do soro sanguíneo - nos testes de ATA, soroaglutinação em tubos e 2-ME. Os resultados desta prova modificada foram comparados com os títulos séricos dos animais, nos mesmos testes. Foram observados títulos iguais ou superiores no teste modificado - utilizando o material das secreções -, comparativamente aos obtidos nos testes convencionais. Os autores afirmam que os altos títulos encontrados nas secreções cervicais poderiam ser atribuídos à alta produção local de IgM e IgG, sugerindo este método modificado como alternativa de diagnóstico, diante da impossibilidade de isolamento de *B. abortus* em animais suspeitos.

No diagnóstico *post-mortem*, os achados anátomopatológicos da brucelose eqüina caracterizam-se por lesões piogranulomatosas em ligamentos, tendões, bursas, sinóvias e articulações (Acha e Szyfres, 2003; Riet-Corrêa *et al.*, 2003). À necropsia, o conteúdo das lesões é purulento, de coloração branco-amarelada e de aspecto viscoso, do qual é possível o isolamento do microrganismo (Riet-Corrêa *et al.*, 2003). Histologicamente, pode-se notar vasculite difusa nas porções serosas, edema com infiltrado leucocitário (macrófagos, neutrófilos e linfócitos), exsudato fibrinoso no tecido conjuntivo e proliferação de células histiocitárias (Paulin, 2003).

Tratamento

À semelhança das demais espécies de animais de produção e de companhia, não se recomenda a terapia da brucelose em eqüinos. Tal conduta é justificada pela manutenção intracelular do microrganismo e a pela indução de lesões piogranulomatosas, que dificultam a obtenção de níveis terapêuticos dos antimicrobianos no interior dos fagócitos e no foco infeccioso na presença de material purulento, justificando, em tese, a baixa efetividade da terapia antimicrobiana convencional. Em que pese a não recomendação da terapia, estão descritos na literatura ensaios terapêuticos experimentais na brucelose em eqüinos e em outros animais de produção, de alto valor zootécnico, sob estrito controle e responsabilidade médico-veterinária (Corrêa e Corrêa, 1992). Neste contexto, Thomassian (2005) indicou a associação entre estreptomicina e tetraciclina por várias semanas, concomitante a drenagem cirúrgica e/ou excisões dos abscessos. Contudo, estes ensaios foram conduzidos em situações controladas, com pequeno número de animais e não mostraram efetividade que justificasse a manutenção dos eqüinos tratados no plantel, ou mesmo os riscos para o homem no manejo dos animais tratados, permanecendo a recomendação de eutanásia para eqüinos com diagnóstico microbiológico e/ou sorológico de brucelose.

Controle e profilaxia

Não existem medidas específicas de controle e/ou profilaxia na brucelose eqüina. No Brasil, as ações estão voltadas ao controle da brucelose em bovinos e búfalos, devido à maior prevalência da doença nestas espécies, à presença de normativa oficial de conduta do PNCEBT e, também, ao fato de que a doença nos eqüinos é causada preferencialmente por *B. abortus*, que predomina nas infecções em bovinos e búfalos. Com efeito, a vacinação sistemática de bezerras entre três e oito meses de idade com vacina atenuada B19 auxilia no controle da brucelose em eqüinos, especialmente em propriedades nas quais ocorre a co-habitação entre bovinos, búfalos e eqüinos.

A aquisição de eqüinos de propriedades livres ou não-endêmicas para brucelose e a adoção de quarentena para animais recém-adquiridos também são procedimentos indicados no controle e na profilaxia. Na vigência de animais suspeitos, faz-se importante isolar o animal, submeter material clínico para o diagnóstico microbiológico, e também fazer exames sorológicos. Na presença de animais com isolamento microbiano e/ou sorológico, recomenda-se a eutanásia dos animais em frigorífico ou abatedouro inspecionado, além de investigação soroepidemiológica de animais contactantes.

B. abortus pode permanecer viável por seis meses ou mais em pastos contaminados por fetos e líquidos de placenta de fêmeas bovinas ou bubalinas que abortaram (Lucero *et al.*, 2008). Assim, em pastos ou piquetes de criação de bovinos ou búfalos com abortamento recente pelo microrganismo, aos quais os eqüinos têm acesso, recomenda-se impedir o ingresso de eqüinos e ruminantes por no mínimo seis meses, cortar a da pastagem, bem como o destinar corretamente as carcaças e os líquidos fetais.

Em face do reduzido estudo do sorodiagnóstico da brucelose em eqüinos, faz-se prudente adotar os mesmos métodos sorológicos recomendados no PNCEBT, quais sejam: ATA, 2-ME e Fixação de Complemento.

Brucelose no homem

As principais espécies de *Brucella* spp. patogênicas para o homem são, em ordem decrescente, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis* (Corrêa e Corrêa, 1992). A Organização Mundial da Saúde estima em aproximadamente 500.000 casos/ano de brucelose humana, embora se acredite que este número seja subestimado (OIE, 2002). A doença no homem é descrita principalmente no Mediterrâneo, na Ásia, na Índia e na América Latina (Castro *et al.*, 2005). A ocorrência da brucelose humana está intimamente relacionada com o consumo de alimentos contaminados, com o contato estreito com animais domésticos (Acha e Szyfres, 2003), e/ou como doença ocupacional para magarefes, criadores e veterinários (Metcalf *et al.*, 1994).

Mandell *et al.* (1995) relataram que as principais formas de infecção por *Brucella* spp no homem decorrem da transmissão direta do patógeno mediante contato com soluções de continuidade ou com a pele lesada, inoculação acidental em conjuntivas, inalação em abatedouros e/ou consumo de produtos e derivados contaminados de origem animal. No Brasil, Oliveira e Ribeiro (2000) investigaram a soroprevalência da brucelose em funcionários de abatedouros em Uberlândia, MG. Os autores verificaram que 10,89% de indivíduos reagentes são predominantemente do sexo masculino (81,82%), entre 21 e 35 anos de idade (72,72%), com baixo grau de escolaridade e baixa renda familiar mensal (65,34%). Recentemente, Gonçalves *et al.* (2006) estudaram a ocorrência da brucelose em 150 trabalhadores de frigorífico da região norte do Paraná utilizando ATA e 2-ME, e encontraram 0,66% de indivíduos reagentes.

A prevenção da brucelose humana pode ser alcançada pela educação sanitária dos profissionais, que inclui utilização de luvas e vestimentas apropriadas no manuseio de animais suspeitos, desinfecção de utensílios, cuidados no uso da vacina atenuada, destino correto de abortamentos, placentas e secundinas de animais domésticos, pasteurização de produtos lácteos, assim como adoção de procedimentos oficiais previstos no PNCEBT, como a eutanásia dos animais infectados. Para humanos, eqüinos, suínos e cães não há, até o momento, a disponibilidade de vacinas comerciais (Paulin, 2003; Castro *et al.*, 2005).

Considerações finais

A brucelose é considerada doença de potencial zoonótico, de evolução crônica, incomum em eqüinos, causada predominantemente por *B. abortus*. A doença em eqüinos não é caracterizada por transtornos reprodutivos, manifestada principalmente por lesões abscedantes em região cervical, bursas, tendões e articulações. A transmissão ocorre provavelmente pelo consumo de água e pastos contaminados, principalmente em propriedades endêmicas para brucelose bovina.

Não se recomenda a terapia, e os animais infectados devem ser encaminhados para abate sanitário. O diagnóstico microbiológico é definitivo, e o sorológico é realizado utilizando, basicamente, as mesmas provas recomendadas para bovinos, apesar de não haver padronização de interpretação para a espécie eqüina. As descrições sobre a brucelose eqüina geralmente se apresentam sob a forma de relatos de casos ou inquéritos soroepidemiológicos regionais. Pouca preocupação tem sido despendida com os achados epidemiológicos na brucelose eqüina e a caracterização dos biotipos do microrganismo, que poderiam contribuir no melhor



reconhecimento dos mecanismos de transmissão e na virulência da bactéria, que podem subsidiar ações de controle e profilaxia da doença na espécie e, conseqüentemente, auxiliarem no sucesso de programas de controle da brucelose em outras espécies domésticas.

Referências

- Acha PN, Szyfres B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p. 28-56.
- Ali AH, Zaidam WA, Sharma VK. Sero-prevalence of brucellosis in horses in Iraq. *Indian Vet J*, v.62, p.917-921, 1985.
- Almeida CAS, Ribeiro MG, Megid J, Vasconcellos AS, Borges AS, Bonesi G. Ocorrência de aglutininas anti-*Brucella abortus* em soros de equídeos de abatedouro. In: Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária, 2, 2007, Fortaleza, CE. Fortaleza: CNSPV, 2007. (CD-ROM).
- Alton GG, Maw J, Rogerson BA., McPherson GG. Serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. *Austr Vet J*, v.51, p.57-63, 1975.
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCBET*. Brasília, DF: MAPA, Secretária de Defesa Animal, 2006. 188p.
- Carrigan MJ, Cockram FA, Nash GV. *Brucella abortus* biotype 1 arthritis in a horse. *Austr Vet J*, v.64, p.190, 1987.
- Carter GR, Chengappa MM. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991. p. 196-201.
- Castro AC, González RS, Prat IM. Brucellosis: uma revisão practica. *Acta Bioq Clín Latinoam*, v.39, p.203-216, 2005.
- Cohen ND, Carter GK, Mullan WC. Fistulous withers in horses. *J Am Vet Med Assoc*, v.201, p.121-124, 1992.
- Cook DR, Kingston GC. Isolation of *Brucella suis* biotype 1 from a horse. *Austr Vet J*, v.65, p.162-163, 1988.
- Corrêa WM, Corrêa CNM. *Enfermidades infecciosas dos animais domésticos*. 2. ed. São Paulo: Madsj, 1992. p. 213-215.
- Dawson FLM, Durrant DS. Some serological reactions to “*Brucella*” antigen in the horse. *Equine Vet J*, v.9, p.158-160, 1975
- Ekers BM. *Brucella* cultures typed by the who *Brucellosis* Centre of the Common wealth serum laboratories, Melbura. *Austr Vet J*, v.54, p.440-443, 1987.
- Godoy AM, Barg L. Aspectos epidemiológicos da infecção brucélica. 2- Investigação sorológica em cavalos de corrida. *Arq Esc Vet UFMG*, v.28, p.121-123, 1976.
- Gonçalves DD, Teles PS, Reis CR, Lopes FMR, Freire RL, Navarro IT, Alves LA, Muller EE, Freitas JC. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, v.48, p.135-140, 2006.
- González RA, Gonzáles-Reyes I, Flores-Gutiérrez GH. Prevalence of *Brucella abortus* antibodies in equines of a tropical region of México. *Can J Vet Res*, v.70, p.302-304, 2006.
- Langenegger J, Szechy AM. Brucelose dos equídeos domésticos: isolamento de *Brucella abortus* de bursites de cernelha no Brasil. *Arq Inst Biol Anim*, v.4, p.49-63, 1961.
- Langoni H, Silva AV. Comportamento sorológico de aglutininas anti-*Brucella* em soro de equídeos. *Rev Bras Med Vet*, v.19, p.85, 1997.
- Lopes CFA, Molnár L, Molnár E. Avaliação soroepidemiológica da brucelose em animais e humanos procedentes da zonabragantina no Estado do Pará, Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.429-431, 1999.
- Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect*, v.136, p.496-503, 2008.
- Macmillan AP, Cockrem DS. Observations on the long term effects of *Brucella abortus* infection in the horses, including effects during pregnancy and lactation. *Equine Vet J*, v.18, p.388-390, 1986.
- Macmillan AP, Greisser-Wilke I, Moeninnig V, Mathias LA. A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, v.97, p.83-85, 1990.
- Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Principles and practice of infections*. 4. ed. London: Churchill Livingstone, 1995. p.2054-2055.
- Megid J, Albert D, Fagliari JJ, Paes AC, Listoni FJP, Pinto MRA, Ribeiro MG, Thiebaud M, Ueno T, Garin-Bastuji B. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. *Vet Rec*, v.156, p.147-148, 2005.
- Metcalf HE, Luchsinger DW, Ray WC. Brucellosis. In: Beran, GW, Steele, JH (Ed.). *Handbook of zoonoses. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39.
- Nielsen K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. *Arch Med Vet*, v.27, p.9-17, 1995.
- Nielsen K. Development of live *Brucella* vaccines. In: Adams LG (Ed.). *Advances in Brucellosis Research*. College Station, TX: Texas A&M University Press, 1990. p.251-276.



- Nielsen K. Development of live *Brucella* vaccines. In: Adams LG (Ed.). *Advances in Brucellosis Research*. College Station, TX: Texas A&M University Press, 1990. p.251-276.
- Nielsen, K, Duncan, JR. *Animal brucellosis*. USA: CRC Press, 1990. 453p.
- Nielsen, K, Gall, D, Lin, M, Massngill, C, Samartino, L, Perez, B, Coats, M, Hennager, S, Dajer, A, Nicoletti, P, Thomas, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Vet Immunol Immunopatol*, v.66, p.321-329, 1998.
- Nielsen K, Gall D, Smith P, Kelly W, Yeo J, Kenny K, Heneghan T, Mcnamara S, Maher P, O'Connor J, Walsh B, Carrol J, Rojas X, Rojas F, Perez B, Wulff O, Buffoni L, Salustio E, Gregoret R, Samartino L, Dajer A, Luna Mastinez E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Vet Microbiol*, v.21, p.163-170, 2001.
- Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, Nicolletti P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet Microbiol*, v.100, p.25-30, 2004.
- Office Internacional des Epizooties. Código zoonosológico internacional. Enfermidades dos bovinos da lista B. Recomendações aplicáveis às enfermidades específicas. Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2002.
- Oliveira PR, Ribeiro SC. Estudo sobre a brucelose em trabalhadores de um abatedouro de eqüídeos. *Hig Alim*, v.13, p.8-63, 2000.
- Oliveira QC, Moreira VS, Lima CS. Brucelose em eqüinos. *Rev Med*, v.9, p.93-106, 1973.
- Omer MK, Skjerve E, Holstad G, Woldehiwet Z, Macmillan AP. Prevalence antibodies to *Brucella* spp. in cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. *Epidemiol Infect*, v.125, p.447-453, 2000.
- Paulin LM. Brucelose. *Arq Inst Biol*, São Paulo, v.70, p.239-249, 2003.
- Paulin LM, Prado GES, Federsoni ISP, Teixeira AC, Castro V, Genovez ME. Estudo comparativo dos testes 2- Mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. *Arq Inst Biol São Paulo*, v.69, p.41-47, 2002.
- Poester PF, Gonçalves PSV, Lage AP. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol*, v.90, p.55-62, 2002.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe, 1994. p.261-267.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.963-994.
- Reed SM, Bayly WM. *Medicina interna eqüina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.75.
- Ribeiro MG, Nardi Júnior G, Megid J, Paes AC, Listoni FJP. Anti-*Brucella abortus* agglutinins in serum and secretion of fistulous withers in horses. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.55, p.99-101, 2003.
- Riet-Corrêa F, Schild AL, Méndez MC, Lemos R. *Doenças de ruminantes e eqüinos*. 2. ed. São Paulo: Varela, 2003. p.187-197.
- Robertson FJ, Milne J, Silver CL, Clark H. Abortion associated with *Brucella abortus* (biotype1) in mare. *Vet Rec*, v.92, p.480-481, 1973.
- Rosa I, Gonzales A, Reyes GI, Gutierrez FHG. Prevalence of *Brucella abortus* antibodies in equines of a tropical region of México. *Can J Vet Res*, v.70, p.302-304, 2006.
- Santellano-Estrada E, Infante F, Días-Aparício E, Flores-Gutierrez GH. Use of a immunobinding test on nitrocellulose paper to diagnose caprine brucellosis. *Vet Res Commun*, v.28, p.27-31, 2004.
- Smith BP. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1994. p.1171-1172.
- Thomassian A. *Enfermidades dos eqüinos*. 4. ed. São Paulo: Varela, 2005. 573p.
- Vasconcellos SA, Ito FH, Côrtes JA. Bases para a prevenção da brucelose animal. *Comum Cient Fac Med Vet Zootec USP*, v.1, p.25-36, 1987.
- Viana, FC, Reis, R, Santos, WLM. Inquérito sorológico para brucelose eqüina em Minas Gerais. *Arq Esc Vet UFMG*, v.33, p.431-435, 1981.