

Rebeca Barbosa Pauletti

**SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Brucella Abortus* A  
AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA  
BRUCELOSE HUMANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2010

P326 Pauletti, Rebeca Barbosa, 1983-  
Susceptibilidade de isolados brasileiros de *Brucella abortus* a agentes antimicrobianos utilizados no tratamento da brucelose humana / Rebeca Barbosa Pauletti. – 2010.  
51 p. :il.

Orientador: Andrey Pereira Lage  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Brucelose – Tratamento – Teses. 2. *Brucella abortus* – Teses.  
3. Agentes infecciosos – Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

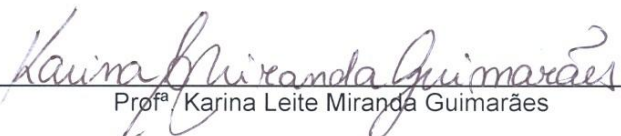
CDD – 636.089 695 7

Dissertação defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Prof. Andrey Pereira Lage  
Orientador



---

Profª Karina Leite Miranda Guimarães



---

Prof. Joaquim Eustáquio de Souza Amado

Página em Branco

*Ao meu pai Orlando Paletti Jr. e  
ao meu avô Prof. José Barbosa,  
mestres que me inspiraram e me  
incentivaram nesta jornada.*

*Dedico...*

## **AGRADECIMENTOS**

À Fapemig, CNPq, FEP-MVZ pelo apoio financeiro ao projeto.

A CAPES pelo apoio financeiro individual, através da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Andrey Pereira Lage pela oportunidade de crescer como pesquisadora e pessoa.

À minha família que me apoiou e incentivou em todos os momentos desta jornada. Em especial ao meu pai, minha mãe e minha irmã pelo carinho, dedicação e amor que sempre tiveram por mim e que foram essenciais para que eu tivesse forças para lutar e conquistar meus objetivos. Aos meus avós queridos. Amo todos vocês!

Ao Fernando Machado e Silva, pela atenção, amor, companheirismo e, principalmente, pelo apoio emocional e pela paciência nos momentos de aflição. Agradeço muito por ter você ao meu lado daqui pra frente é pra vida toda. Te amo!

Em especial a Ana Paula, Telma e Monalisa pela participação direta e dedicação na execução deste projeto. A Juliana e a Sílvia pela ajuda imprescindível nos momentos de dificuldade e a Elaine pelos tantos PCRs.

Aos amigos do LBA/DMVP/EV/UFMG (Ana Paula, Telma, Monalisa, Juliana, Sílvia, Elaine, Karina, Giovanna, Adriano e Abel) pela amizade, risadas e, principalmente, apoio nos momentos difíceis.

Às meninas de IC (Ethiene, Karina e Paloma) e a nossa querida ex-estagiária, hoje aluna de mestrado, Jordana pela amizade e ajuda no preparo do material necessário a execução do projeto.

Aos amigos do Laboratório de Vírus II (Alessandro, Filipe e Fernanda) pela amizade e pelas parcerias de sucesso.

Aos professores Marcos Bryan Heinemann e Maria Auxiliadora Roque de Carvalho (através de sua aluna Simone Cristina) que tanto me ajudaram na execução deste projeto, tanto através do apoio e incentivo quanto do conhecimento e experiência compartilhados.

Aos Funcionários da DMVP/EMVZ/UFMG, pela atenção e auxílio na execução do projeto.

Aos amigos de Belo Horizonte, pelos momentos especiais que vivemos nesses sete anos (risadas, farras, estudos). Em especial, a minha amiga Déborah Tolentino (Hertape Calier), por ter me ajudado a conseguir parte do material necessário para a execução do projeto.

---

## SUMÁRIO

---

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>9</b>
<b>ASPECTOS ZONÓTICOS DA BRUCELOSE BOVINA.....</b>	<b>9</b>
Resumo .....	10
Abstract .....	10
1. Introdução.....	11
2. <i>Brucella abortus</i> .....	12
3. Brucelose Bovina.....	12
4. Brucelose Humana.....	14
4.1. <i>Epidemiologia</i> .....	14
4.2. <i>Sintomatologia Clínica</i> .....	17
4.3. <i>Diagnóstico</i> .....	19
4.4. <i>Tratamento</i> .....	20
5. Antimicrobianos Usados para o Tratamento da Brucelose Humana.....	22
6. Bioterrorismo .....	25
7. Referências Bibliográficas.....	26
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>34</b>
<b>SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS BRASILEIROS DE BRUCELLA ABORTUS A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....</b>	<b>34</b>
Resumo .....	35
Abstract .....	35
1. Introdução.....	36
2. Materiais e métodos.....	38
2.1. <i>Amostras</i> .....	38
2.2. <i>Identificação das Amostras</i> .....	38
2.3. <i>Genotipificação</i> .....	38
2.4. <i>Determinação da Sensibilidade aos Antimicrobianos</i> .....	39
3. Resultados.....	40
4. Discussão .....	45
5. Conclusões.....	48
6. Referências Bibliográficas.....	48

---

## LISTA DE TABELAS

---

### **CAPÍTULO 1 \_ ASPECTOS ZONÓTICOS DA BRUCELOSE**

- Tabela 1 – Recomendações para o tratamento da brucelose humana sem complicações sérias (adultos não gestantes) ..... 21
- Tabela 2 – Principais mecanismos de resistência, descritos em *Brucella* spp., a antimicrobianos usados no tratamento da brucelose humana. .... 24

### **CAPÍTULO 2 \_ SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *BRUCELLA ABORTUS* A AGENTES ANTIMICROBIANOS**

- Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade a sete antimicrobianos de 150 isolados brasileiros de *Brucella abortus* entre os anos de 1977 e 2009. .... 41
- Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade a sete antimicrobianos de 150 isolados brasileiros de *Brucella abortus* entre 1977 e 2009 – segundo o CLSI (Performance..., 2008)..... 42
- Tabela 3 - Perfil de susceptibilidade a sete antimicrobianos de isolados brasileiros de *Brucella abortus*, agrupados por Estado, segundo o CLSI (Performance..., 2008)..... 43
- Tabela 4 - Origem, perfil, biotipificação e genotipificação pelo MLVA-16 (Le Flèche et al., 2006; Al-Dahouk et al., 2007; Minharro, 2009) das nove amostras de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil que apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados..... 44



## **CAPÍTULO 1**

### **ASPECTOS ZONÓTICOS DA BRUCELOSE BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA**

## RESUMO

Esta atualização sobre a brucelose tem o objetivo de abordar a situação epidemiológica da brucelose humana no Brasil e no mundo, suas fontes de infecção e grupos de risco, sintomatologia clínica, tratamento, características dos antimicrobianos utilizados para o tratamento da doença no ser humano, assim como seus mecanismos de resistência. Além disso, aborda o papel de *Brucella* spp. como agente de bioterrorismo.

**Palavras-chave:** *Brucella* spp., brucelose, zoonose, saúde pública, bioterrorismo

## ABSTRACT

*The goal of this update of brucellosis as a zoonotic disease is to address the human brucellosis and its epidemiological situation in Brazil and in the world, their sources of infection and risk groups, clinical symptoms, treatment and characteristics of the antimicrobials used to treat disease in humans. It discusses the role of Brucella spp. as an agent of bioterrorism.*

**Keywords:** *Brucella* spp., brucellosis, zoonosis, public health, bioterrorism

## 1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa, altamente contagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella* e considerada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) uma das doenças mais importantes e difundidas no mundo (Corbel et al., 2006).

O gênero *Brucella* é constituído por dez espécies que podem infectar diferentes espécies animais, mas revelam preferência quanto ao hospedeiro e apresentam diferença de patogenicidade (Osterman e Moriyón, 2006; Foster et al., 2007; Scholz et al., 2008): *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (canídeos), *B. ceti* (cetáceos), *B. inopinata* (ser humano), *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. microti* (*Microtus arvalis*), *B. neotomae* (*Neotoma lepida*), *B. ovis* (ovinos), *B. pinnipedialis* (*pinipenídeos*) e *B. suis* (*suídeos*). Em 2005 uma amostra de *Brucella* spp. foi isolada a partir de um implante de mama de uma paciente de 71 anos de idade nos Estados Unidos, com sintomas clínicos compatíveis aos da brucelose (Kumar et al., 2008). Posteriormente, esta foi reconhecida como uma nova espécie chamada de *Brucella inopinata* (Scholz et al., 2009), que também foi isolada de uma amostra de biópsia de pulmão de um paciente de 52 anos de idade com pneumonia obstrutiva crônica na Austrália (Tiller et al., 2010). Recentemente foi descrita a infecção de babuínos em cativeiro (*Papio* spp.). Os isolados eram morfológicamente compatíveis com *Brucella* spp., porém suas características fenotípicas eram distintas daquelas das espécies atualmente descritas neste gênero (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2009).

A brucelose é uma zoonose de distribuição mundial, que acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos bastante significativos. Em bovinos, a doença acomete, preferencialmente, fêmeas em idade reprodutiva ativa, provocando abortos, nascimento de bezerros fracos e

retenção de placenta (Corbel et al., 2006). Nos machos, a infecção por *B. abortus* é geralmente assintomática, podendo em alguns casos desenvolver orquite com consequente infertilidade por diminuição da qualidade espermática (Campero, 1993). Em suínos, cabras, cavalos e cães, a infecção por *Brucella* spp. também provoca aborto nas fêmeas e orquite nos machos. Já em ovinos, a infecção por *B. ovis* causa uma doença conhecida como epididimite dos carneiros.

A infecção humana ocorre pelo consumo de leite ou derivados não pasteurizados e pelo contato com material de aborto de animais infectados. A brucelose é uma zoonose que apresenta um forte caráter ocupacional, já que tratadores, veterinários e magarefes, por força de suas atividades, frequentemente manipulam anexos placentários, fluidos fetais e carcaças de animais, expondo-se ao risco de infecção quando esses materiais provêm de animais infectados (Manual..., 2006). Outra frequente fonte de infecção humana é a contaminação laboratorial. A brucelose é reportada como a principal doença adquirida em laboratório, o que reforça a necessidade do emprego de medidas estritas de biossegurança quanto à manipulação do agente e materiais infectados em laboratórios (Fiori et al., 2000). Vale lembrar que a dose infectante de *Brucella* spp., especialmente da *B. melitensis*, é muito baixa sendo estimada em 10 organismos (Georghiou et al., 1991).

A doença no ser humano é caracterizada, na maioria das vezes, por sintomas inespecíficos normalmente associados às infecções por diferentes agentes, o que dificulta o diagnóstico. Entre os sintomas mais comuns se destacam a febre, a sudorese noturna, dores musculares e articulares. Na fase aguda prevalece a febre intermitente recorrente e, na fase crônica, endocardite, artrite e osteomielite (Manual..., 2006).

Em geral, o tratamento da brucelose humana é feito pela associação de antimicrobianos e é bastante prolongado

(seis semanas). Para que haja sucesso da terapia no homem, o início precoce e a escolha correta do antimicrobiano são fundamentais (Young, 1995; Corbel *et al.*, 2006).

*Brucella* spp. é listada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos como pertencente a categoria B, grupo em segunda ordem de prioridade como agente de bioterrorismo. Este fato gera uma preocupação quanto ao reconhecimento pela classe médica dos casos que possam estar associados a episódios bioterroristas (Klietmann e Ruoff, 2001; Robinson-Dunn, 2002).

A *Brucella melitensis*, considerada a espécie mais patogênica para o homem, é exótica no Brasil (Poester *et al.*, 2002), assim a grande maioria dos casos de brucelose humana são relacionados a *Brucella abortus*.

## 2. BRUCELLA ABORTUS

Os bovinos são os hospedeiros preferenciais de *B. abortus*, mas outros animais, incluindo bisões, camelos, iaques, como também equídeos, suínos, ovinos, caprinos, bubalinos e cães podem ser infectados por essa espécie de *Brucella* (Crawford *et al.*, 1990; Carter e Chengappa, 1991; Bathke, 1999). O bisão e o alce são reservatórios em potencial para a brucelose que poderiam servir como fonte de infecção para os bovinos (McCorquodale e DiGiacomo, 1985).

Existem sete biovariedades de *B. abortus* (biovars 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9) que são diferenciadas uma das outras por provas bioquímicas, incluindo testes de sensibilidade a corantes (tionina e fuccina básica), requerimento de CO<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S e presença de antígenos de superfície (A ou M) (Alton *et al.*, 1988). No Brasil, já foram relatadas cinco destas biovariedades (1, 2, 3, 4 e 6) (Minharro, 2009).

As bactérias do gênero *Brucella* são resistentes a diversos fatores ambientais e *B. abortus* pode permanecer por longos

períodos (seis meses ou mais) em material de aborto ou parto nas pastagens. O aumento da temperatura, da luz solar direta ou a diminuição da umidade diminuem esta resistência (Crawford *et al.*, 1990; Brasil, 2006a). A *B. abortus* é sensível à pasteurização e a desinfetantes (cal, cloro, cresol, fenol e formol) para instalações, utensílios e ambientes (Russel e Koulikovskii, 1984; Manual..., 2006).

## 3. BRUCELOSE BOVINA

A brucelose bovina é causada, principalmente, por *Brucella abortus*. Outras espécies de *Brucella*, como *B. suis* e *B. melitensis*, podem, mais raramente, causar brucelose nos bovinos quando estes estão em contato com suínos e caprinos e ovinos, que são respectivamente, os portadores naturais destes agentes (Ewalt *et al.*, 1997). Vale ressaltar que *B. melitensis* é exótica no Brasil (Poester *et al.*, 2002; Manual..., 2006).

As principais manifestações clínicas da doença são o aborto no terço final da gestação, a retenção de placenta e o nascimento de bezerros fracos (Thoen *et al.*, 1993; Acha e Szyfres, 2003). Os machos são, em sua maioria, assintomáticos, porém podem desenvolver orquite que pode estar associada à vesiculite seminal e epididimite (Rankin, 1965; Mc Caughey e Purcell, 1973).

A transmissão da brucelose bovina se dá principalmente por via oral, mas também tem grande importância a via aerógena (Crawford *et al.*, 1990; Acha e Szyfres, 2003). O contato direto dos animais com fetos abortados, placentas e descargas uterinas infectadas e eliminadas no ambiente no momento do parto ou do aborto é a principal fonte de infecção para os animais susceptíveis (Crawford *et al.*, 1990). O hábito dos bovinos de lambem e cheirar animais recém-nascidos ou mesmo fetos abortados também favorece este tipo de transmissão (Nicoletti, 1980; Silva *et al.*, 2005).

A monta natural não representa grande risco de transmissão da brucelose, pois o macho deposita o sêmen na vagina onde existem defesas inespecíficas que dificultam a infecção (Nicoletti, 1980; Campero, 1993). Entretanto, durante a inseminação artificial com sêmen contaminado por *B. abortus*, o sêmen é depositado diretamente no útero, onde não existem estas barreiras inespecíficas, aumentando assim o risco de infecção (Crawford *et al.* 1990; Campero, 1993). Por outro lado, a transferência de embriões, quando realizada segundo protocolos internacionalmente preconizados de lavagem e tratamento do embrião, não representa risco de transmissão da doença e já foi empregada com sucesso para o aproveitamento de vacas positivas de alta linhagem (Stringfellow e Seidel, 1999).

A brucelose está na lista de doenças notificáveis da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sendo considerada como enfermidade transmissível, importante do ponto de vista socioeconômico e sanitário em nível nacional e com significativa repercussão no comércio internacional de animais e de seus produtos (Manual..., 2008).

A importância econômica da brucelose bovina está relacionada às perdas diretas causadas por abortos, natimortos e nascimento de bezerros fracos, retenção de placenta, metrite, perda de peso, queda da produção de leite e aumento do período entre as lactações, perda do valor de comercialização e condenação de carcaças de animais infectados (Thoen *et al.*, 1993; Lage *et al.*, 2008b).

Outro fator que deve ser considerado é a redução progressiva do rebanho pela diminuição da natalidade, em consequência do aborto e do nascimento de bezerros fracos, aumentando assim os gastos com reposição de animais (Miranda *et al.*, 2008).

A brucelose bovina está amplamente distribuída no mundo e sua prevalência é maior em países em desenvolvimento e menor em países desenvolvidos (Crawford *et al.*, 1990; Young, 1995). Alguns países como a Dinamarca, Finlândia, Noruega,

Áustria, Holanda e Luxemburgo já receberam a qualificação de livres da brucelose bovina. França, Grécia, Irlanda, Itália, Portugal e Espanha estão em fase de erradicação (Godfroid e Käsbohrer, 2002). Porém, em muitos países como Israel, Kuwait, Arábia Saudita, Brasil e Colômbia, a brucelose é considerada uma doença reemergente (Corbel *et al.*, 1997). Na América Central, a prevalência da brucelose bovina tem sido estimada entre 4 e 8% e os programas de controle da doença tem sido pouco efetivos no controle de seu avanço (Moreno, 2002).

No Brasil, o último estudo de âmbito nacional de prevalência da brucelose bovina foi realizado em 1975 (Brasil, 1977). Em 2003 foi estabelecida uma cooperação técnica entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Universidade de São Paulo com o intuito de desenvolver estudos epidemiológicos para a caracterização da situação epidemiológica da brucelose bovina pelas universidades federais. Até o momento já foram concluídos estudos em 15 unidades federativas: Bahia, Santa Catarina, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo, Sergipe e Tocantins (Poester *et al.*, 2009).

A infecção por *B. abortus* foi identificada em todos os estados da Federação, mas com diferença da prevalência entre os estados. Os resultados encontrados revelaram que Santa Catarina possui a menor prevalência e que Mato Grosso é o estado com maior prevalência. Esse dado sugere que a brucelose pode estar mais disseminada na região Centro-Oeste do Brasil, região que concentra o maior número de bovinos de corte no país (Brasil, 2006b). A prevalência no Estado de Minas Gerais foi estimada em 1,09% de animais positivos e 6,04% de focos. Esta prevalência baixa é creditada à implantação de um programa de vacinação obrigatório e progressivo iniciado em 1992, que culminou com a cobertura total do estado em 1998 (Lage *et al.*, 2005). Apesar da prevalência relativamente baixa de animais infectados por *B. abortus* no Estado

de Minas Gerais, a introdução do programa de erradicação baseado no diagnóstico e sacrifício de animais positivos ainda não foi possível, em função do número elevado de propriedades com animais infectados. Desta forma, o emprego preliminar de medidas que diminuam a prevalência da brucelose no estado é de fundamental importância antes de se iniciarem as medidas de erradicação da brucelose (Lage, et al. 2008a).

As medidas de controle adotadas nos casos de brucelose envolvem medidas econômicas e de saúde pública. Estas medidas podem ser classificadas em duas categorias gerais: de higiene e de vacinação. A higiene inclui todos os procedimentos que tem por objetivo limitar a exposição de animais susceptíveis tais como isolamento, restrições comerciais, sacrifício de animais positivos e desinfecção (Lage et al., 2005, Nicoletti, 2005).

Práticas agropecuárias modernas como o aumento efetivo do rebanho e um comércio mais intenso do gado levam à introdução de animais infectados em rebanhos previamente saudáveis e a um aumento da persistência da doença (Nicoletti, 2005).

Vários países possuem medidas de controle para brucelose com o objetivo de reduzir a prevalência ou erradicar a doença proveniente de animais domésticos numa tentativa de prevenir a transmissão desta para o homem. Os programas regulamentares são geralmente influenciados pela prevalência da doença dentro da população animal e da população humana e de considerações econômicas. Programas para erradicar ou reduzir as infecções por *Brucella abortus* incluem: programas de teste e sacrifício, saneamento ou vacinação (Olsen e Stoffregen, 2005). Deve-se ressaltar que o tratamento da brucelose bovina não é permitido e todos os bovinos infectados devem ser sacrificados.

No Brasil, foi lançado no ano de 2001 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) visando

a implantação de um programa de vacinação obrigatória contra a brucelose com a vacina B19, a realização de estudos de prevalência da doença em vários estados do país e a formação de recursos humanos para atuar no programa (Brasil, 2001; Manual..., 2006).

#### 4. BRUCELOSE HUMANA

A brucelose é transmitida ao homem principalmente pelo contato direto com placenta infectada, fetos ou secreções uterinas de bovinos, ovinos, caprinos, suínos e camelos, ou pelo consumo de alimentos contaminados. As espécies mais patogênicas para o homem são *B. melitensis* e *B. suis*, enquanto *B. abortus* é considerada de patogenicidade moderada e *B. canis* de baixa patogenicidade para o homem (Hartigan, 1997). Espécies de *Brucella* de origem marinha também foram reconhecidas como causadoras de infecção no homem (Sohn et al., 2003; McDonald et al., 2006). Um estudo relatou não haver diferença clínica significativa entre os casos de brucelose causados por *B. melitensis* e *B. abortus* (Dokuzoguz et al., 2005).

A brucelose humana é uma doença de difícil diagnóstico em função dos sintomas apresentados serem geralmente inespecíficos e é considerada uma doença eminentemente ocupacional. Em países que possuem estatísticas confiáveis de infecção humana por *B. abortus*, observa-se uma alta taxa de infecções em médicos veterinários por acidentes ocorridos pelo manuseio de vacinas (Ashford et al., 2004; Santos et al., 2005; Corbel et al., 2006). Martinez e colaboradores (2003) relataram a ocorrência de surtos da doença através do consumo de leite cru oriundo de animais infectados. Por ser uma zoonose, quase todos os casos humanos têm origem animal, assim a erradicação da doença em seres humanos está diretamente relacionada com sua erradicação em animais (Nicoletti, 2002).

##### 4.1. Epidemiologia

O primeiro caso de brucelose humana no Brasil foi descrito em 1913 por Gonçalves

Carneiro (Veronesi, 1976). Houve um grande número de publicações sobre a doença entre 1930 e 1950, nas quais os casos de infecção por *Brucella* spp. ocorreram em magarefes e trabalhadores envolvidos com o processamento de carnes.

Na espécie humana, a brucelose é considerada uma antroponose e uma doença ocupacional (Doganay e Aygen, 2003). A incidência da doença no homem é pouco conhecida (Corbel, 1997). Em contrapartida, a susceptibilidade do ser humano ao agente etiológico da doença tem importância relevante, pois a Organização Mundial de Saúde estima que a cada ano surjam 500 mil novos casos, afetando principalmente pessoas envolvidas com a bovinocultura (Doenças..., 2006; Pappas et al., 2006). Sabe-se que este número é subestimado particularmente em algumas regiões do mundo em parte pelo longo período de incubação (variando de meses a anos) e presença de sintomas inespecíficos, principalmente na fase aguda.

A brucelose humana é endêmica em países da bacia do Mediterrâneo, da península Árabe, no subcontinente indiano, partes do México, da América Central e do Sul (Pessegueiro et al., 2003). Em contraste com os países do Norte e do Centro da Europa, onde a brucelose tem sido gradualmente eliminada, a sua prevalência ainda é alta, ou até continua a aumentar nos países do Mediterrâneo, representando um importante problema de saúde pública em Portugal, Espanha, sul da França, Itália, Grécia e Turquia (Godfroid e Kasbohrer, 2002; Pappas et al., 2006).

No Brasil os estudos soroepidemiológicos, embora escassos, realizados em diversas partes do país e em diferentes grupos ocupacionais, como fazendeiros, vaqueiros, médicos veterinários e funcionários de matadouro, demonstram a ocorrência da brucelose humana, além de avaliarem os fatores de risco envolvidos na infecção. Na região Norte, Lopes (1999), em um estudo soroepidemiológico realizado no Estado do Pará, verificou que 32% (16/50) das pessoas que mantinham contato com bovinos foram sororreagentes para

brucelose. Na região Centro-Oeste, um estudo realizado com trabalhadores rurais do Município de Araputanga, MT, avaliou os fatores de risco associados à ocorrência de brucelose em indivíduos reagentes para *Brucella abortus* (Schein, 2006). Na região Sul, Gonçalves et al. (2006) observaram que 0,66% (1/150) de indivíduos que trabalhavam em um frigorífico no Estado do Paraná eram positivos para brucelose. Na região Sudeste, Vasconcelos (2003) realizou um estudo para conhecer o perfil sorológico de estudantes, residentes e pós-graduados de Medicina Veterinária pela pesquisa de anticorpos anti-*B. abortus*. Nesse estudo não foi identificada nenhuma amostra reagente na população estudada. Na região Nordeste, Lacerda et al. (2000) observaram 10,17% (6/59) de magarefes sorologicamente reagentes em dois matadouros do Município de São Luis, MA. Em Pernambuco, no Município de Garanhuns, Mendonça (1997) encontrou 2,99% de indivíduos positivos, usando a técnica do antígeno acidificado tamponado para pesquisa de anticorpos anti-*B. abortus* de vários grupos ocupacionais, dentre eles trabalhadores de mercado de carne, pecuaristas, tratadores de animais e estudantes de Medicina Veterinária.

A transmissão da brucelose pode ocorrer por diferentes vias. A ingestão é a forma mais frequente de transmissão em decorrência do hábito de consumo de leite cru. Apesar do conhecimento da epidemiologia e das vias de transmissão da doença ser muito antigo, surtos resultantes do consumo de leite contaminado continuam ocorrendo (Martínez et al., 2003). A carne crua com restos de tecidos linfáticos e o sangue de animais infectados podem conter microrganismos viáveis, portanto, de igual modo representam risco para a população consumidora. É importante ressaltar que o leite e a carne quando submetidos a tratamento térmico, não trazem risco à saúde pública (Manual..., 2006).

A infecção por contato direto é mais frequente em fazendeiros, veterinários, trabalhadores rurais e magarefes, sendo considerada nestes casos uma doença

ocupacional (Blood e Radostitis, 1991). As vias de infecção nos casos de contato direto com animais infectados são: conjuntival, respiratória ou por penetração do agente por lesões na pele. A inoculação acidental também pode ocorrer durante a manipulação de seringas com microrganismos vivos, especialmente durante a vacinação (Aguilera, 2005).

O manuseio das vacinas B19 e RB51, patogênicas para o homem, também põem em risco algumas classes de profissionais, como médicos veterinários e vacinadores (Ashford et al., 2004; Santos et al., 2005; Corbel et al., 2006).

Magarefes, trabalhadores da indústria de laticínios e donas de casa, pelo contato com carne e leite contaminados têm maior risco de infecção (Manual..., 2006; Berkelman, 2003).

Os abatedouros são um ambiente propício para a ocorrência de infecção ocupacional, uma vez que, além dos operários trabalharem em contato direto com as carcaças, o ambiente do abatedouro favorece a formação de grande quantidade de aerossóis que podem potencialmente transmitir o agente. Estas condições resultam em frequente exposição dos magarefes ao agente, particularmente, em áreas endêmicas (Barbuddhe et al., 2000). Há também relatos de casos de infecção por *Brucella* spp. de indivíduos que trabalham com empacotamento de carnes (Landau e Green, 1999).

Machos castrados e aqueles que ainda não atingiram a idade reprodutiva e que estão infectados não são fontes de infecção direta para outros bovinos, mas têm importância na transmissão ao homem durante o abate em frigoríficos (Brucelose..., 2002).

Os homens são mais comumente afetados do que as mulheres (Mantur et al., 2006), isto se deve pelo maior risco da exposição ocupacional. A brucelose humana afeta pessoas de todas as faixas etárias. O controle da brucelose nos animais domésticos resulta indiretamente no

controle da doença humana (Pessegueiro et al., 2003).

A brucelose é a infecção bacteriana mais frequente de ser adquirida em laboratórios (Young, 1995). A transmissão da brucelose em laboratórios de pesquisa e de diagnóstico é bem documentada na literatura (Arlett, 1996), tendo sido relatada até mesmo a ocorrência de surtos de brucelose em pessoal de laboratório (Fiori et al., 2000). Laboratoristas por manipularem grandes massas bacterianas na produção de vacinas e antígeno, ou mesmo na rotina de diagnóstico direto, podem se infectar por meio de soluções de continuidade da pele ou contato com mucosas, sobretudo a conjuntiva e a mucosa respiratória (Manual..., 2006). Um aspecto importante da transmissão laboratorial é que não necessariamente os casos estão relacionados a acidentes. Aparentemente, os aerossóis formados por práticas microbiológicas rotineiras são uma forma comum de transmissão (Martin-Mazuelos et al., 1994). Por ser a infecção laboratorial mais comum é imprescindível a implantação de medidas de biossegurança na manipulação de *Brucella* spp., principalmente, em laboratórios de pesquisa, local onde ocorre a maioria dos acidentes (Richmond e McKinney, 1993). *Brucella* spp. são classificadas dentro do grupo 3 de biossegurança por serem potencialmente transmitidas por aerossóis e em alguns casos serem capazes de produzirem infecções letais. A manipulação laboratorial de culturas vivas ou de materiais contaminados de animais infectados assim como de produtos de abortos é perigosa e deve ser feita em laboratório com nível 3 ou superior de biossegurança (Manual..., 2004).

A transmissão da brucelose e sua prevalência na região dependem de vários fatores, como hábitos alimentares, métodos de processamento do leite e seus derivados, costumes sociais, práticas pecuárias, condições climáticas, estado socioeconômico e higiene ambiental. A sanitização ambiental é particularmente importante no contexto da transmissão via aérea (Joint..., 1986; Mantur et al., 2007).



A transmissão de pessoa a pessoa não é comum e a maioria dos autores a considera insignificante do ponto de vista epidemiológico (Godfroid et al., 2005). A transfusão de sangue, o transplante de tecidos e a transmissão sexual são rotas possíveis de infecção, porém raras (Corbel et al., 2006).

#### 4.2. Sintomatologia Clínica

A brucelose humana geralmente se manifesta por estado febril agudo com duração menor que dois meses ou subagudo, com duração que varia de dois a doze meses. O período febril pode persistir por tempo maior que 1 ano e progredir para uma doença incapacitante crônica com severas complicações. Alguns autores (Pappas et al., 2005) têm considerado que esta classificação possui uma limitada importância clínica. Pessoas infectadas com *Brucella* spp. normalmente apresentam sinais e sintomas inespecíficos semelhantes aos da gripe sazonal e de doenças septicêmicas. Os mais comuns são febre, fadiga, dor de cabeça, sudorese, mialgia, artralgia e perda de peso (Mantur et al., 2004; Mantur et al., 2006). Em alguns casos os pacientes apresentam somente dores articulares e lombares, movimentos involuntários dos membros, ardor nos pés (Mantur et al., 2006) ou ataque cardíaco isquêmico (Bingol e Togay-Isikay., 2006).

A doença é aguda em cerca de metade dos casos, com um período de incubação que varia de duas a três semanas. Na outra metade dos casos, o início é insidioso, com sinais e desenvolvimento de sintomas durante um período de semanas a meses após a infecção (Corbel et al., 2006).

*B. melitensis* é associada com infecções agudas enquanto as infecções causadas por outras espécies são geralmente subagudas ou prolongadas. A forma aguda da brucelose humana é caracterizada por um quadro febril que oscila durante o dia. A falta de uma terapia adequada durante a fase aguda pode resultar na disseminação da bactéria por vários tecidos e resultar em uma doença subaguda ou crônica com

complicações clínicas graves, envolvendo principalmente alterações músculo-esqueléticas (Colmenero et al., 1996; Mantur et al., 2007).

O envolvimento ósseo e articular são as complicações mais frequentes da brucelose, ocorrendo em 20 a 60 % dos casos. As articulações são atingidas de forma assimétrica, sobretudo as grandes articulações de carga, como a coluna lombar, articulação coxofemoral, joelho, entre outros. A osteomielite brucélica predomina na coluna, podendo evoluir para espondilodiscite com ou sem formação de abscessos e posterior fusão dos corpos vertebrais.

As lesões osteoarticulares incluem artrite, osteomielite, tenossinovite e bursite (Pessegueiro et al., 2003). A análise do líquido sinovial revela predominância de linfócitos mononucleares, sendo possível identificar a bactéria em até 50% dos casos (Khateeb et al., 1990; Young, 1995). As alterações típicas ou sugestivas de osteomielite vertebral podem ser observadas por tomografia axial computadorizada (TAC), porém a ressonância magnética é a técnica radiológica mais sensível e específica para detectar este tipo de lesão (Khateeb et al., 1990; Carragee, 1997)

Na brucelose transmitida por via alimentar os sintomas sistêmicos predominam sobre queixas gastrointestinais. No entanto, alguns pacientes com a doença apresentam náuseas, vômitos, dor e desconforto abdominal. Raros casos de ileíte, colite e peritonite bacteriana espontânea foram relatados (Corbel et al., 2006).

O fígado é comprometido na maioria dos casos de brucelose, mesmo quando os testes de função hepática indicam normalidade ou valores ligeiramente alterados (Pessegueiro et al., 2003).

As complicações do trato respiratório podem ser encontradas, mais comumente, em magarefes e estão relacionadas à inalação da *Brucella* spp. (Karimi et al., 2003). Sua apresentação é bastante variável, desde

síndromes gripais até pneumonias, abscessos pulmonares e derrame pleural (Garcia-Rodriguez et al., 1989; Al-Jam'a et al., 1993). Raramente os microrganismos são identificados na expectoração (Pessegueiro et al., 2003).

Orquite e epididimite são as complicações mais frequentes (12/16) da brucelose envolvendo o sistema geniturinário nos homens. Geralmente, a orquite unilateral nos casos de brucelose pode se assemelhar ao câncer testicular ou à tuberculose (Navarro-Martinez et al., 2001; Mantur et al., 2007).

Em mulheres gestantes a infecção por *Brucella* spp. aumenta o risco de aborto espontâneo ou de transmissão intra-uterina da infecção para o feto (Khan et al., 2001; Giannacopoulos et al., 2002). O aborto é uma frequente complicação da brucelose nos animais, onde a localização placentária está associada com eritritol, um estimulante do crescimento de *B. abortus*. Apesar desta substância não estar presente no tecido placentário humano, a bacteremia por *Brucella* spp. pode resultar em aborto, especialmente durante os primeiros trimestres. O pronto diagnóstico e tratamento da brucelose durante a gravidez pode salvar a vida do feto. A transmissão da brucelose de mães lactantes aos seus filhos através da amamentação é muito rara, porém já foi relatada (Corbel et al., 2006).

A endocardite infecciosa é a manifestação cardiovascular mais comum e é dita como a causa mais comum de morte por brucelose. Endocardite é relatada em cerca de 2% dos casos e pode envolver tanto as válvulas cardíacas nativas quanto as protéticas. A válvula aórtica está envolvida com mais frequência que a válvula mitral (Pessegueiro et al., 2003; Corbel et al., 2006). O tratamento da endocardite causada por *Brucella* spp. geralmente requer uma combinação de terapia antimicrobiana e de substituição da válvula através de cirurgia (Al-Kasab et al., 1988; Corbel et al., 2006). O reconhecimento precoce, a adequada antibioticoterapia e a ausência de sinais de falência cardíaca podem guiar o médico à

escolha de um tratamento prolongado e conservativo (Reguera et al., 2003).

A neurobrucelose refere-se a uma variedade de complicações neurológicas associadas com brucelose. A invasão direta do sistema nervoso central ocorre em cerca de 5% dos casos de infecção por *B. melitensis* e meningite ou meningoencefalite são as manifestações mais comuns. A meningite por *Brucella* spp. pode ser aguda ou crônica. Análise do líquido cefalorraquidiano geralmente revela um alto conteúdo protéico, concentração de glicose normal ou baixa e pleocitose linfocítica (Corbel et al., 2006). *Brucella* spp. é raramente isolada no líquido cefalorraquidiano (LCR) entretanto, anticorpos específicos podem ser demonstrados no LCR e no soro (Sanchez-Sousa et al., 1990).

Várias lesões cutâneas têm sido relatadas em pacientes com brucelose, incluindo erupções cutâneas, nódulos, pápulas, eritema, petéquias e púrpura (Corbel et al., 2006).

Apesar de incomuns, lesões oculares podem ser observadas em pacientes com brucelose. Uveíte é a manifestação mais frequente. Como ainda não foi relatado isolamento de *Brucella* spp. a partir das estruturas do olho nos seres humanos, muitas das lesões oculares são consideradas complicações tardias, possivelmente imunologicamente mediadas. Consequentemente, o tratamento indicado para essas complicações é o uso de corticosteróides (Pessegueiro et al., 2003).

A brucelose é uma doença sistêmica que pode afetar vários órgãos, desta forma mesmo que as evidências clínicas não sejam inteiramente compatíveis, quando há possibilidade de infecção por *Brucella* spp., o diagnóstico diferencial se faz necessário, especialmente em áreas endêmicas (Pappas et al., 2005). A doença mostra sérias consequências à saúde pública, determinando inabilidade temporária para o trabalho, tratamentos longos e caros, recuperação demorada e ainda sequelas

sérias no sistema locomotor e sistema nervoso (Louzã, 1993).

Os pacientes cujos sintomas clínicos persistam durante 12 meses ou mais a partir do momento do diagnóstico se enquadram em três categorias: recidiva, infecção crônica localizada, e convalescença retardada. A recidiva é definida como a recorrência de sinais e sintomas característicos (com ou sem uma cultura positiva) que ocorrem em algum momento após a conclusão de um curso de tratamento. A infecção crônica localizada é caracterizada pela ocorrência de sinais e sintomas característicos (com ou sem uma cultura positiva do sangue) causados pela incapacidade de eliminar um foco de infecção profunda, como osteomielite, ou abscessos profundos e pode exigir intervenção cirúrgica para drenar focos de infecção, além de terapia antimicrobiana. Convalescença retardada é por sua vez definida como a persistência dos sintomas, sem sinais característicos de infecção, como febre, em pacientes que tenham completado um curso da terapia, e nos quais os títulos de anticorpos declinaram ou mesmo desapareceram. Estes pacientes parecem não se beneficiar com cursos repetidos da terapia antimicrobiana (Corbel et al., 2006).

### 4.3. Diagnóstico

Informações epidemiológicas como história de exposição a animais e a comidas exóticas ou leite e derivados não pasteurizados são muito importantes para o diagnóstico de infecção por *Brucella* spp. Em todos os casos uma amostra de sangue do paciente deve ser coletado e o teste laboratorial deve ser solicitado, já que o diagnóstico definitivo para brucelose deve ter confirmação laboratorial (Young et al., 1995). Um diagnóstico definitivo e rápido é extremamente importante para eliminação da infecção, assim como um tratamento específico e prolongado com antibióticos (Solera et al., 1997).

Ferramentas laboratoriais usadas para diagnóstico da brucelose incluem

isolamento e identificação da *Brucella* spp. de amostras clínicas, detecção do antígeno, demonstração do genoma e de anticorpos específicos contra *Brucella* spp. Culturas sanguíneas continuam a ser o padrão ouro de diagnóstico e fornecem provas definitivas da brucelose, mas podem não fornecer um resultado positivo para todos os pacientes, mesmo em condições ideais (Colmenero et al., 1997; Pappas et al., 2006). A aspiração e cultura da medula são consideradas por muitos uma técnica bastante sensível (Gotuzzo et al., 1986), apesar de ser um procedimento invasivo e doloroso. As bactérias do gênero *Brucella* possuem um crescimento relativamente lento e o resultado da cultura pode não se tornar disponível por vários dias ou semanas. Em particular para pacientes com doenças crônicas, a sensibilidade da cultura pode ser baixa (Mantur et al., 2007). A detecção laboratorial e a identificação de *Brucella* spp. são baseadas principalmente no isolamento e na caracterização fenotípica (Alton, 1988).

Quando a confirmação bacteriológica não é possível, o diagnóstico baseia-se na detecção de títulos elevados ou na subida de título de anticorpos específicos (anti-*Brucella*) (Pessegueiro et al., 2003). O diagnóstico sorológico padrão utiliza o teste da soroaglutinação lenta em tubos e confirma o diagnóstico da doença quando um único título  $\geq 160$  é encontrado ou quando o aumento de quatro vezes no título de anticorpos é observado entre o início da doença e a fase de convalescência. Outros métodos sorológicos como o ELISA e o Western Blot também são utilizados, mas ainda precisam de normalização (Bossi et al., 2004).

A amplificação de ácido nucléico tem sido explorada para a rápida detecção e confirmação do diagnóstico de infecção por *Brucella* spp. A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método rápido que pode ser aplicado em uma ampla variedade de espécimes clínicos (Pappas et al., 2003), pois apresenta sensibilidade muito maior do que o isolamento do agente em várias formas de apresentação clínica da brucelose humana (Morata et al., 2001).

Quatro espécies de *Brucella* e alguns de seus biovars podem ser discriminados pela chamada AMOS-PCR, um ensaio multiplex com cinco pares de primers diferentes (Bricker e Halling, 1994). No entanto, uma técnica de PCR, que permite a diferenciação de isolados de *Brucella* tanto em espécies quanto em biovars ainda não foi desenvolvida.

Embora ainda não sejam usados na rotina, os métodos moleculares são bastante promissores, tendo grande utilidade para o acompanhamento pós terapêutico e para a detecção precoce de agravamentos da infecção (Morata et al., 1999). Embora possam ter grande aplicação no futuro, deve ser lembrado que para a realização das técnicas moleculares são necessários infraestrutura e equipamentos adequados além de pessoal capacitado e treinado (Navarro et al., 2004).

#### 4.4. Tratamento

Para que a terapia contra a brucelose humana seja eficaz alguns aspectos devem ser considerados: (i) o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível; (ii) com combinação de drogas incluindo pelo menos uma droga com boa penetração nas células e (iii) a terapia deve ser prolongada. O tratamento da brucelose humana é uma área controversa por causa do espectro da doença, da possibilidade de infecção crônica e do desenvolvimento de complicações (Radolf, 1994). Muitos agentes antimicrobianos são ativos contra as espécies de *Brucella*, no entanto, a eficácia clínica nem sempre se correlaciona com a susceptibilidade *in vitro* (Hall, 1990). Em todos os casos, é importante que o paciente termine o curso completo da terapia, pois o risco de recidivas e de recuperação incompleta é consideravelmente alto (Solera et al., 1998).

Os antimicrobianos mais utilizados são as tetraciclina, os aminoglicosídeos, a rifampicina, o cotrimoxazol (combinação de sulfametoxazol e trimetoprim), as quinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração. A escolha da associação de

antimicrobianos deve levar em conta diversos fatores, como: idade, gravidez, toxicidade potencial e gravidade do quadro clínico (Pessegueiro et al., 2003).

O tratamento recomendado pela Organização Mundial da Saúde para os casos agudos de brucelose em adultos é rifampicina 600 a 900 mg e doxiciclina 100 mg duas vezes ao dia por no mínimo seis semanas (Joint..., 1986). Alguns autores ainda afirmam que a combinação antes estabelecida de estreptomicina (1g/dia por duas a três semanas) por via intramuscular com uma tetraciclina (2g/dia por seis semanas) oral propicia menos recidivas (Mantur et al., 2006) (Tabela1). Além disso, apesar da rifampicina ser econômica e ter boa penetração intracelular, seu uso apresenta inúmeras desvantagens quando comparado ao da estreptomicina, como: a indução de aumento da velocidade de metabolização hepática da doxiciclina, a toxicidade intrínseca para o organismo humano e seu uso reservado como tuberculostático (Colmenero et al., 1994; Pessegueiro et al., 2003).

A brucelose em crianças pode ser tratada com sucesso com uma combinação de doxiciclina 4mg/kg/dia e rifampicina 10mg/kg/dia, por via oral, por seis semanas (Mantur et al., 2004). Alguns autores recomendam que a gentamicina (5mg/kg/dia, via IM) seja administrada concomitantemente nos primeiros cinco a sete dias de terapia para prevenir recidivas (Mantur et al., 2004; Hall, 1990). Resultados satisfatórios podem ser obtidos com o uso de Co-trimoxazole (8/40 mg/kg/dia, duas vezes ao dia, via oral) administrado por seis semanas em associação com estreptomicina (30mg/kg/dia, uma vez ao dia, via intramuscular) durante 3 semanas ou com gentamicina (5mg/kg/dia, uma vez ao dia, via intramuscular ou endovenosa) durante 7 a 10 dias (Corbel et al., 2006). Rifampicina com ou sem uma combinação de cotrimoxazole provou ser segura para o tratamento de brucelose durante a gravidez (Pappas et al., 2005; Ozbay e Inanmis, 2006).

Vale ressaltar que a rifampicina não é indicada para o tratamento da brucelose humana nos casos de acidentes vacinais com a vacina RB51. Este fato pode ser explicado por esta amostra vacinal ter sido elaborada a partir de diversas passagens da

amostra de *Brucella abortus* 2308, originalmente lisa, em meios seletivos contendo baixas doses de rifampicina, tornando-a resistente *in vitro* a este antimicrobiano (Schurig *et al.*, 1991; Ashford *et al.*, 2004).

Tabela 1 – Recomendações para o tratamento da brucelose humana sem complicações sérias (adultos não gestantes)

Tratamento	Droga	Dose (mg)	Administração		Duração (semanas)	Ref. <sup>2</sup>
			Via	Doses <sup>1</sup>		
<b>Primeira Linha</b>	Doxiciclina <sup>3</sup>	100	Oral	2	6	A
	Rifampicina <sup>3</sup>	900	Oral	1	6	
	Doxiciclina <sup>4</sup>	100	Oral	2	6	B/C
	Estreptomicina <sup>4</sup>	15/kg*	IM	1	2 a 3	
	Doxiciclina	100	Oral	2	6	D
	Rifampicina	900	Oral	1	6	
	Gentamicina	240	IM	1	2	
<b>Segunda Linha</b>	Doxiciclina	100	Oral	2	6	C
	Gentamicina	5/kg	IM	1	1	
	Doxiciclina	100	Oral	2	6	D
	Rifampicina ou	900	Oral	1	6	
	Tetraciclina	500	Oral	4	6	
	Gentamicina /	240	IM	1	2	
	Estreptomicina	1000	IM	1	2	
<b>Alternativo</b>	Tetraciclina	500	Oral	4	6	A
	Estreptomicina	1000	IM	1	2 a 3	
<b>Opcional</b>	SXT <sup>5</sup>	800/160 <sup>6</sup>	Oral	2	6	A
	SXT	800/160*	Oral	2	6	B/C/D
	Doxiciclina	100	Oral	2	6	
	Outra base <sup>7</sup>				6	
	Ofloxacina ou	400	Oral	2	6	C
	Ciprofloxacina	500	Oral	2	6	
	Doxiciclina	100	Oral	2	6	
Outra base				6		

1 – Doses Diárias; 2 – Ref. – A – Joint WHO/FAO, 1986; B – Corbel *et al.*, 2006 (\*); C – Ariza *et al.*, 2007; D – Skalsky *et al.*, 2008; 3 – Tratamento indicado como alternativo por Ariza *et al.*, 2007; 4 – Tratamento indicado como alternativo por Skalsky *et al.*, 2008; 5 – SXT – sulfametoxazol + trimetoprim; 6 – Sulfametoxazol – 800 mg + trimetoprim – 160 mg; 7 – Outra base: doxiciclina, ciprofloxacina, estreptomicina, gentamicina, ofloxacina, rifampicina, sulfametoxazol + trimetoprim ou tetraciclina; \* Segundo Corbel *et al.*, 2006 a dose para estreptomicina é de 1000mg/dia e para SXT é de sulfametoxazol 400mg + trimetoprim 80 mg.

Alguns tipos de tratamento não são recomendados para o tratamento da brucelose humana. Ariza e colaboradores (2007) não recomendam a utilização de azitromicina, pois estudos demonstraram a inadequação desta droga para o tratamento da brucelose humana ou de meropenem, por ser uma droga de alto custo e por sua importância no tratamento de infecções mais severas. Já Skalsky e colaboradores (2008) relatam que a monoterapia é menos eficaz do que o uso de antimicrobianos combinados, que tratamentos com duração menor do que trinta dias tem maior chance de falhas ou recidivas e que a combinação de quinolonas com rifampicina ou doxiciclina é menos eficaz do que a combinação de doxiciclina com rifampicina ou estreptomicina.

A maioria das falhas no tratamento da brucelose não ocorre em função da resistência às drogas primárias (Solera et al., 1997), mas são atribuídas ao estilo de vida intracelular da *Brucella* spp., portanto, as drogas com uma boa penetração intracelular são necessárias para o sucesso do tratamento (Hall, 1990). No entanto, casos esporádicos de resistência aos antibióticos têm sido descritos (Turkmani et al., 2006).

Até o presente, não foi desenvolvida nenhuma vacina eficaz e segura para o homem, embora já tenham sido usadas vacinas vivas atenuadas e vacinas criadas a partir de subunidades da *Brucella* spp., que demonstraram pouca utilidade prática, pois conferiam proteção para as formas mais graves por um período inferior a dois anos, além do risco elevado no caso das vacinas vivas (Corbel, 1997; Pessegueiro et al., 2003).

##### **5. ANTIMICROBIANOS USADOS PARA O TRATAMENTO DA BRUCELOSE HUMANA**

A escolha de um antimicrobiano para o tratamento de uma infecção bacteriana deve seguir critérios importantes, como a identificação do organismo infectante e a determinação de sua sensibilidade aos agentes antimicrobianos (Rang et al., 1997).

Também devem ser levados em consideração alguns aspectos do hospedeiro, como a exposição prévia a antibióticos, a idade, as funções hepática e renal, a administração concomitante de outras drogas que possam interagir negativamente com o antibiótico e o fato do paciente estar gestante ou com o sistema imunológico comprometido (Craig, 2004; Betts et al., 2003).

As tetraciclina são antibióticos bacteriostáticos, de amplo espectro, que atuam por inibição da síntese protéica após sua captação nos microrganismos sensíveis por transporte ativo. O grupo inclui a tetraciclina, a oxitetraciclina, a doxiciclina e a minociclina (Rang et al., 1997). As drogas neste grupo estão estreitamente relacionadas, assim organismos sensíveis à tetraciclina também são considerados sensíveis a doxiciclina e minociclina. Entretanto, alguns organismos de sensibilidade intermediária ou resistentes à tetraciclina podem ser sensíveis a doxiciclina, minociclina ou a ambas (Methods..., 2006). Segundo critério interpretativo para a classificação das amostras de *Brucella* spp. como sensíveis ou resistentes à doxiciclina, estabelecido pelo CLSI, amostras que apresentem concentração inibitória mínima  $\geq 1\mu\text{g/ml}$  são consideradas resistentes (Performance..., 2008). Yamazham e colaboradores (2005) analisaram 44 amostras de *B. melitensis* isoladas a partir de culturas sanguíneas de pacientes adultos com brucelose aguda entre 1998 e 2003 na Turquia e relataram que a susceptibilidade antimicrobiana destes isolados mostram que a doxiciclina foi mais ativa do que as quinolonas e os macrolídeos testados.

Os aminoglicosídeos são um grupo de antibióticos com uma estrutura química complexa, que se assemelham quanto à atividade antimicrobiana, características farmacocinéticas e toxicidade. Estreptomicina, gentamicina e ampicacina pertencem a esse grupo de antibióticos (Rang et al., 1997; Methods..., 2006). Os aminoglicosídeos inibem a síntese protéica bacteriana e são bactericidas. São mais amplamente usados contra microrganismos

Gram negativos. A gentamicina é o aminoglicosídeo mais comumente usado e a amicacina a de mais amplo espectro, podendo ser eficaz em infecções causadas por microrganismos resistentes à gentamicina (Rang et al., 1997; Methods..., 2006). Segundo os critérios interpretativos para a classificação das amostras de *Brucella* spp. como sensíveis ou resistentes à gentamicina e à estreptomicina, temos que amostras que apresentem concentração inibitória mínima  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  e  $\geq 8\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, são resistentes a estes antimicrobianos (Performance..., 2008). Vale ressaltar que não foram estabelecidos critérios interpretativos para a classificação das amostras de *Brucella* spp. como sensíveis ou resistentes à amicacina.

As sulfonamidas são drogas bacteriostáticas que atuam por interferência com a síntese do ácido fólico e, portanto, com a síntese de nucleotídeos (Rang et al., 1997). O sulfametoxazol é testado em combinação com trimetoprim e a associação entre os dois antibacterianos provoca uma inibição sequencial de dois passos na via metabólica dos folatos em algumas bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. O uso deste par de drogas sugere que a combinação de agentes quimioterápicos pode ser uma estratégia eficaz na cura de infecções bacterianas (Rang et al., 1997). O ponto de corte para a classificação das amostras de *Brucella* spp. como sensíveis ou resistentes à combinação de sulfametoxazol + trimetoprim é de  $\geq 2/38\mu\text{g/ml}$  para amostras resistentes (Performance..., 2008). Turkmani e colaboradores (2006) relataram que oito das setenta e quatro amostras de *B. melitensis* estudadas apresentaram susceptibilidade intermediária a sulfametoxazol-trimetoprim (STX).

As quinolonas são bactericidas que interferem na síntese dos ácidos nucleicos durante o processo de reparação e de replicação do DNA e inibem enzimas responsáveis pela manutenção de um DNA funcional, as topoisomerases II (uma DNA-girase) e IV (Walsh, 2003). Esse grupo de fármacos (quinolonas e fluorquinolonas) inclui um número de agentes estreitamente relacionados. As fluorquinolonas têm

excelente distribuição nos tecidos e fluidos corporais. A ciprofloxacina, antibiótico de amplo espectro, é a fluorquinolona mais comumente utilizada. É importante no tratamento de infecções por bastonetes e cocos Gram-negativo, facultativos e aeróbios (Rang et al., 1997). Vários estudos são focados na atividade das quinolonas contra *Brucella* spp., pois estes agentes antimicrobianos constituem uma atraente alternativa para o tratamento de brucelose humana. Os pontos de corte estabelecidos para a classificação das amostras de *Brucella* spp. como sensíveis ou resistentes à ciprofloxacina e à ofloxacina são, respectivamente, de  $\geq 1\mu\text{g/ml}$  e  $\geq 2\mu\text{g/ml}$  para resistência (Performance..., 2008). Embora a resistência *in vitro* às quinolonas não seja alta, a eficácia destes antibióticos permanece controversa pela seleção de cepas resistentes e por não alcançar uma atividade bactericida eficaz em concentrações intracelulares (Garcia-Rodriguez et al., 1991; Rubinstein et al., 1991; Akova et al., 1993; Qadri et al., 1995).

A rifampicina é um derivado semi-sintético da rifamicina B, um produto natural da classe de antibióticos ansamicina, que atua na subunidade  $\beta$  da RNA polimerase dependente do DNA tendo ação bactericida tanto para microrganismos extracelulares quanto intracelulares (Walsh, 2003). As amostras de *Brucella* spp. podem ser classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes à rifampicina e o ponto de corte estabelecido para essa classificação é de, respectivamente,  $\leq 1\mu\text{g/ml}$ ,  $2\mu\text{g/ml}$ ,  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  (Performance..., 2008). Em um estudo realizado com 74 isolados de *B. melitensis* foi observada boa atividade bactericida da rifampicina. Entretanto, duas amostras apresentaram sensibilidade reduzida a este antibiótico (Turkmani et al., 2006).

Cerca de três quartos dos casos de resistência à rifampicina são decorrentes de mutações localizadas nas posições 406 e 411 dos resíduos das cadeias laterais da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (Spratt, 1994). O desenvolvimento de resistência é relativamente rápido se a rifampicina é

utilizada como agente único no tratamento de infecções (Heep et al., 2000). Marianelli e colaboradores (2004) relataram a associação de mutações específicas no gene *rpoB*, codificador da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, com o desenvolvimento de resistência a rifampicina em amostras de *Brucella* spp.

As bactérias podem desenvolver múltiplos mecanismos contra um agente único ou classes de agentes, sendo que uma única alteração pode resultar no desenvolvimento de resistência a antibióticos diferentes (Kaye et al., 2000). Em algumas estirpes bacterianas, os mecanismos de resistência podem coexistir tornando-as multirresistentes aos antibióticos (Sousa, 2001). Em bactérias da microbiota hospitalar, podemos encontrar múltiplos mecanismos de resistência, como aquisição de vários genes de resistência em ambiente de grande consumo de antibióticos e mutação de um único gene que confere resistência a múltiplos antibióticos (por alteração da permeabilidade e mecanismos de efluxo).

A bomba de efluxo é um mecanismo, dependente de energia, responsável pelo bombeamento de substâncias tóxicas indesejáveis e de antimicrobianos para fora da célula. Alguns sistemas de efluxo são medicamentos específicos, enquanto outros podem acomodar múltiplas drogas e, assim contribuir para a multirresistência bacteriana. Os transportadores de efluxo bacterianos são classificados dentro de

cinco grandes superfamílias, com base na sequência de aminoácidos e na fonte de energia usada para exportar os substratos, sendo a RND (resistance-nodulation-cell division) exclusiva das bactérias Gram-negativo (Morita et al., 2006). As bombas de efluxo geralmente consistem em uma proteína transmembrana mono competente que abrange vários domínios. No entanto, as bactérias Gram-negativo, que são protegidas por uma membrana externa, os transportadores de efluxo podem ser organizados como sistemas de vários componentes, em que a bomba de efluxo localizada na membrana interna trabalha em conjunto com uma proteína de fusão periplasmática e uma proteína de membrana externa (Bambeke et al., 2003). Braibant e colaboradores (2002) descreveram pela primeira vez a existência de uma proteína, NorMI, capaz de mediar a resistência às drogas por um mecanismo ativo de efluxo em *B. melitensis*. A existência de um transportador multidrogas indica que, mesmo se a resistência não seja um problema a se considerar no tratamento da brucelose humana, é necessário o estabelecimento de um controle de padrão de sensibilidade de *Brucella* spp. para assegurar um tratamento adequado e a prevenção de crescente desenvolvimento de resistência a antimicrobianos nestas bactérias. Martin e colaboradores (2009) relataram a ocorrência em *B. suis* de genes que quando expressos induzem resistência a tetraciclina e fluorquinolonas, classes de antimicrobianos utilizados no tratamento da brucelose humana.

Tabela 2 – Principais mecanismos de resistência, descritos em *Brucella* spp., a antimicrobianos usados para o tratamento da brucelose humana.

Mecanismo de Resistência	Espécie de <i>Brucella</i>	Antimicrobianos	Referência
Bomba de efluxo	<i>Brucella melitensis</i>	Ciprofloxacina Gentamicina	Braibant et al. (2002)
Mutações genéticas	<i>Brucella abortus</i> (RB51) <i>Brucella melitensis</i> <i>Brucella suis</i>	Rifampicina	Marianelli et al. (2004)
Bomba de efluxo	<i>Brucella suis</i>	Ciprofloxacina Doxiciclina	Martin et al. (2009)



## 6. BIOTERRORISMO

O bioterrorismo é definido como o uso de agentes biológicos para causar doença e / ou morte em seres humanos, animais ou plantas (Klietmann e Ruoff, 2001).

Os agentes de interesse para uso como armas biológicas apresentam algumas características particulares, como adaptação à dispersão por aerossóis, estabilidade no ambiente, facilidade de obtenção em grandes quantidades, alta susceptibilidade da população, provocar tanto morbidade quanto mortalidade alta, ser transmissível pessoa a pessoa e de difícil diagnóstico (Robinson-Dunn, 2002).

O método de contaminação de alimentos ou de abastecimento de água é considerado uma via moderna plausível para a disseminação de alguns agentes biológicos (Franz et al., 1997). Porém, o método mais eficiente de disseminar amplamente agentes biológicos é através da dispersão destes em aerossóis. Este método envolve equipamentos de baixo custo e fácil obtenção que podem produzir aerossóis com partículas de 1 a 10 µm (Franz et al., 1997), que podem permanecer em suspensão por horas e são suficientemente pequenos para atingir bronquíolos distais e alvéolos terminais após a inalação (Klietmann e Ruoff, 2001).

A liberação de agentes biológicos pode ser silenciosa e passar despercebida até que as vítimas comecem a apresentar sintomas e a procurar os serviços de saúde, o que pode acontecer vários dias após o ataque bioterrorista. Esse tempo entre o aparecimento de sintomas e procura por serviço médico é suficiente para contaminação secundária de outras pessoas e assim, a epidemia poderia ocorrer em larga escala (Bellamy e Freedman, 2001). Muitas das doenças causadas por ataques bioterroristas apresentam características relativamente não específicas. Avaliação epidemiológica rigorosa é necessária para descobrir a causa da doença. Um padrão temporal ou geográfico incomum pode sugerir que um

surto de doença não é um fenômeno natural (Bellamy e Freedman, 2001). A detecção precoce de um ataque bioterrorista é crucial para diminuir o número de doentes e mortos (Rotz et al., 2000).

Em resposta às ameaças colocadas pelo terrorismo global, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) propôs uma lista de agentes biológicos críticos que tem potencial para uso em um incidente terrorista (Rotz et al., 2002; Emergency..., 2006). Esta lista inclui uma ampla variedade de agentes biológicos e os classifica em três categorias com base no seu potencial de afetar a saúde pública, o seu potencial de disseminação e necessidades especiais de intervenção de saúde pública. *Brucella* spp. é considerada como pertencente a categoria B, que corresponde ao grupo em segunda ordem de prioridade como agente de bioterrorismo. A classificação dos agentes facilita a coordenação dos esforços de planejamento para a preparação e resposta ao bioterrorismo nos planos local, estadual e federal (Chang et al., 2003). Com esta orientação os sistemas de saúde pública podem enfrentar a ameaça bioterrorista, aumentando a conscientização do setor de saúde e de vigilância para estes agentes relacionados ao bioterrorismo e para a doença que eles causam (Berkelman et al., 2003).

O interesse em *Brucella* spp. como armas biológicas decorre do fato de que a transmissão por via aérea do agente é possível e pelo fato de ser altamente contagiosa, podendo penetrar pelas membranas mucosas como a conjuntiva, orofaringe, trato respiratório e abrasões de pele. Estima-se que 10 a 100 organismos são suficientes para se estabelecer uma infecção por aerossóis em seres humanos. Os sinais e sintomas são semelhantes em pacientes, qualquer que seja a via de transmissão, e são em sua maioria, não específicos (Bossi et al., 2004). *Brucella* spp. pode ser produzida e dispersa a baixo custo e a transmissão para os seres humanos pode resultar em doença prolongada e sequelas a longo prazo (Yagupsky e Baron, 2005).

É estimado que, se um avião liberar 50 kg de *Brucella* spp. ao longo de 2 km sobre uma população de 500.000 pessoas poderia haver, aproximadamente, 500 mortes e 125.000 incapacitações (Bellamy e Freedman, 2001).

Em função da baixa incidência da brucelose nos países industrializados, técnicos de laboratório clínico não se mostram familiarizados com a identificação e manejo de espécies de *Brucella* spp. Práticas não seguras de laboratório durante a manipulação de isolados de *Brucella* spp. resultaram na exposição involuntária ao organismo e em muitos casos da doença adquirida em laboratório, indicando falta de preparo para lidar com ameaças de bioterrorismo envolvendo este agente. O treinamento do pessoal de laboratório na identificação de espécies de *Brucella* spp., adoção de procedimentos padrão, investigação dos riscos laboratoriais, uso de equipamentos de biossegurança, administração profilática de antimicrobianos e acompanhamento das pessoas diretamente expostas são altamente recomendados (Yagupsky e Baron, 2005).

Trabalhos sobre os procedimentos e precauções para o trabalho laboratorial, em episódios de bioterrorismo, tem sido desenvolvidos visando à conscientização da classe médica para que esta esteja apta a reconhecer casos que possam estar associados com estes episódios. O médico veterinário tem papel relevante neste contexto já que muitos dos agentes usados nos ataques bioterroristas, inclusive a *Brucella* spp., são zoonóticos e podem causar danos sérios danos à saúde pública e ao meio ambiente (Klietmann e Ruoff, 2001; Robinson-Dunn, 2002; Bossi et al., 2004).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, v. 3, 580 p., 2003.

AGUILERA, A. E. Clinic aspects of brucellosis in humans. *Brucellosis 2005, Proceedings International Research Conference including the 58<sup>th</sup> Brucellosis Research Conference*, Mérida, Yucatan, México, October, 15-19, 2005.

AKOVA, M.; UZUN, O.; AKALIN, H. E. et al. Quinolones in the treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, n. 9, p. 1831-1834, 1993.

AL-JAM'A, A. H.; ELBASHIR, A. M.; AL-FARIS, S. S. *Brucella pneumonia: A case report*. *Ann Saudi Med*, v. 13, p. 74-77, 1993.

AL-KASAB, S.; AL-FAGIH, M. R.; AL-YOUSEF, S.; et al. *Brucella infective endocarditis: Successful combined medical and surgical therapy*. *J Thorac Surg*, v. 95, p. 862-870, 1988.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D. et al. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 188p.

ARIZA, J.; SERVITJE, O.; PALLARES, R.; et al. Characteristic cutaneous lesions in patients with brucellosis. *Arch Dermatol*, v. 125, n. 3, p. 380-3, 1989.

ARIZA, J.; BOSILKOVSKI, M.; CASCIO, A. et al. Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21<sup>st</sup> Century: The Ioannina Recommendations., v. 4, n. 12, e317, 2007.

ARLETT, P. R. A case of laboratory acquired brucellosis. *British Medical Journal*, v.313, n. 7065, p.1130-1132, 1996.

ASHFORD, D. A.; DI PIETRA, J.; LINGAPPA, J. J. et al. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v.22, n. 25-26, p.3435-3439, 2004.

- BAMBEKE, F. V.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother*, v. 51, p. 1055–1065, 2003.
- BARBUDDHE, S. B.; KUMAR, P.; MALIKA, S. V. et al. Seropositivity for intracellular bacterial infections among abattoir associated personnels. *J Commun Dis*, v.32, n.4, p.295-299, 2000.
- BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. Doenças Infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose, 2ª ed., São Paulo: Roca. v. 2, p.144-160, 1999.
- BELLAMY, R. J.; FREEDMAN, A. R. Bioterrorism. *Q J Med*, v. 94, n.4, p. 227-234, 2001.
- BERKELMAN, R. L. Human illness associated with use of veterinary vaccines. *Clin Infect Dis*, v.37, p.407-424, 2003.
- BETTS, R. F.; CHAPMAN, S. W.; PENN, R. L. – Reese and Betts' A practical approach to infectious diseases – 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- BINGOL, A.; TOGAY-ISIKAY, C. Neurobrucellosis as an exceptional cause of transient ischemic attacks. *Eur J Neurol*, v. 13, n.5, p. 544-8, 2006.
- BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. Clínica Veterinária. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 570-579.
- BOSSI, P.; TEGNELL, A.; BAKA, A. et al. Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-related brucellosis. *Eurosurveillance*, v. 9, n.12, 2004.
- BRAIBANT, M.; GUILLOTEAU, L.; ZYGMUNT, M. S. Functional Characterization of *Brucella melitensis* NorMI, an Efflux Pump Belonging to the Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family. *Antimicrob Agents Chemother*, p. 3050–3053, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. *Diagnóstico de saúde animal*, Brasília, 1977. 735p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. *Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT*. Brasília: Mapa/Das/Das, 2006a. 184p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa. *Situação epidemiológica da brucelose bovina e bubalina no Brasil* (Primeiro Relatório Parcial). Brasília, 2006b. 83p.
- BRICKER, B. J., HALLING, S. M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol*, v. 33, p.1640-1642, 1995.
- BRUCELOSE. Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/Programas/BruTb/doencas/BRU/index.htm>> Acesso em: 25 jan. 2008.
- CAMPERO, C. M. Brucellosis en toros: una revisión. *Rev Med Vet*, v.74, p.8-14, 1993.
- CARRAGEE EJ. The clinical use of magnetic resonance imaginf in pyogenic vertebral osteomyelitis. *Spine*, v. 22, p. 780, 1997.
- CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. *Brucella*. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 4. Ed. Philadelphia: London, p. 196-201, 1991.
- CHANG, M.; GLYNN, M. K.; GROSECLOSE, S. L. Endemic, notifiable bioterrorism-related diseases, United States, 1992-1999. *Emerg Infect Dis*, v. 9, n. 5, p. 556-64, 2003.

- COLMENERO, J. D.; et al. Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of Brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 38, n. 12, p. 2798-2802, 1994.
- COLMENERO, J. D.; REGUERA, J. M.; MARTOS, F. et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: A study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)*, v. 75, n.4, p.195-211, 1996. [Erratum, in: *Medicine (Baltimore)* 1997; 76: 139.].
- CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.2, p.213-221, 1997.
- CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. (Ed.). *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: WHO Press, 2006. 89p.
- CRAIG, W. A. Antibacterial therapy – in Goldman, L.; Ausiello, D. (ed) – *Cecil Textbook of Medicine 22 nd ed*, Saunders, chap 302, pg. 1753-1764, 2004.
- CRAWFORD, R. P.; HUBER, J. D.; ADAMS, B. S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, p. 131-151, 1990.
- CUNHA, S. “Mecanismos de atuação dos antibióticos e mecanismos de resistências aos antibióticos”. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2003. (Palestra proferida no Curso de Antibióticos, Hospitais da Universidade de Coimbra)
- DOENÇAS Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 320p.
- DOGANAY, M.; AYGEN, B. Humana brucellosis: an overview. *Int J Infect Dis*, v.7, n.3, p.173-182, 2003.
- DOKUZOGUZ, B.; ERGONUL, O.; BAYKAM, N. et al. Characteristics of *B. melitensis* versus *B. abortus* bacteraemias. *J Infect*, v. 50, n.1, p. 41-45, 2005.
- EMERGENCY Preparedness and Response. Bioterrorism agents/diseases. Centers for Disease Control and Prevention. Acesso na internet: <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
- EWALT, D. R.; PAYEUR, J. B.; RHYAN, J. C.; et al. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *J Vet Diagn Invest*, v. 9, p. 417–420, 1997.
- FIORI, P. L.; MASTRANDREA, S.; RAPELLI, P. et al. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*, v.38, n.5, p.2005-2006, 2000.
- FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*, v.57, p.2688–2693, 2007.
- FRANZ, D. R.; JAHRLING, P. B.; FRIEDLANDER, A. M. et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA*. v. 278, n. 5, p.399-411, 1997.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, J. E.; TRUJILLANO, I.; et al. *In-vitro* activity of new quinolones against *Brucella melitensis*. *Rev. Infect. Dis.*, v. 11, n. 5, p. 992–993, 1989.
- GARCIA-RODRIGUEZ, J. A.; GARCIA-SANCHEZ, J. E.; TRUJILLANO, I. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *Brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, n. 4, p. 756-759, 1991.
- GEORGHIOU, P. R.; YOUNG, E. J. Prolonged incubation in brucellosis. *Lancet*, v.337, n.8756, p.1543, 1991.
- GIANNAGOPOULOS, I.; ELIOPOULOU, M. I.; ZIAMBARAS, T. et al. Transplacental transmitted congenital brucellosis due to *Brucella abortus*. *J Infect*, v.45, p. 209-210, 2002.

- GODFROID, J.; KÄSBOHRER, A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet Microbiol*, v. 90, n. 1-4, p. 135-145, 2002.
- GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P. et al. 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, n. 3, p. 313-26, 2005.
- GONÇALVES, D. D.; TELES, O. S.; REIS, C. R. et al. Soroepidemiologia e variáveis ocupacionais e ambientais relacionadas à leptospirose, brucelose e toxoplasmose em trabalhadores do frigorífico do Estado do Paraná, Brasil. *Rev Inst Med Tropical de São Paulo*, v.48, n.3, p.135-140, 2006.
- GOTUZZO, E.; CARRILLO, C.; GUERRA, J.; et al. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis – the value of bone marrow culture. *J Infect Dis*, v. 153, p. 122-5, 1986.
- HALL, W. H. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev Infect Dis*, v. 12, n. 6, p. 1060-99, 1990.
- HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Veterinary Journal*, v.50, n.3, p.179-180, 1997.
- HEEP, M.; RIEGER, U.; BECK, D. et al. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n.4, p. 1075-1077, 2000.
- JOINT FAO/WHO expert committee on brucellosis. *World Health Organ Tech Rep Ser*, v. 740, p.1–132, 1986.
- KARIMI, A.; ALBORZI, A.; RASOOLI, M. et al. Prevalence of antibody to *Brucella* species in butchers, slaughterers and others. *East Mediterr Health J*, v. 9, n. 1-2, p. 178-84, 2003.
- KAYE, K. S.; FRAIMOW, H. S.; ABRUTYN, E. "Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management". *Infect Dis Clin North Am*, v. 14, n. 2, p. 293-319, 2000.
- KHAN, M. Y.; MAH, M. W.; MEMISH, Z. A. Brucellosis in pregnant women. *Clin Infect Dis*, v. 32, n. 8, p. 1172-1177, 2001.
- KHATEEB, M.I.; ARAJ, G. F.; MAJEED, S. A.; et al. *Brucella* arthritis: A study of 96 cases in Kuwait. *Ann Rheum Dis*, v. 49, p. 994-998, 1990.
- KLIETMANN, W. F.; RUOFF, K. L. Bioterrorism: implications for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Rev*, v. 14, n. 2 p. 364-381, 2001.
- KUMAR, DE B., STAUFFER L.; KOYLASS, M.S.; et al. Novel *Brucella* Strain (BO1) Associated with a Prosthetic Breast Implant Infection *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 1, p.43-49, 2008.
- LACERDA, L. M.; ALVES, L. C. M.; MATHIAS, L. A. et al. Brucelose em trabalhadores de matadouros do Município de São Luis, MA, 1997. *Higiene Alimentar*, v. 14, p. 62-65, 2000.
- LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P. Controle da brucelose bovina. *Cad. Tec. Vet. Zootec.*, n.47, p.30-41, 2005.
- LAGE, A. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LÔBO, J. R. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal; 2008. *Leite Integral*, v. 3, p. 40-46, 2008 a.
- LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A. et al. Brucelose bovina: uma atualização. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 32, p. 202-212, 2008b.
- LANDAU, Z.; GREEN, L. Chronic brucellosis in workers in a meat-packing plant. *Scand J Infect Dis*, v.31, n.5, p.511-512, 1999.

- LOPES, C. F. A. 1999. Avaliação Soro epidemiológica da Brucelose em Animais e Humanos Procedentes de Alguns Municípios do Estado do Pará, Brasil. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Belém. 112p.
- LOUZÃ, A. C. Brucelose – modelo de zoonose de impacto sócio – econômico. *Medicina Veterinária*, n. 44 p.23-7, 1993.
- MANTUR, B. G.; AKKI, A. S.; MANGALI, S. S. et al. Childhood brucellosis - a microbiological, epidemiological and clinical study. *J. Trop. Pediatr*, v.50, p. 153-7, 2004.
- MANTUR, B. G.; BIRADAR, M. S.; BIDRI, R. C. et al. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area. *J Med Microbiol*, v. 55, p. 897-903, 2006.
- MANTUR, B. G.; AMARNATH, S. K.; SHINDE, R. S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J Med Microbiol*, v. 25, n. 3, p. 188-202, 2007.
- MANUAL técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/DAS, 2006. 184p.
- MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. WHO, 2004. Acesso na Internet: <www.oie.int> em 22 de junho de 2008.
- MANUAL of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 5 ed. Paris: Office International des Epizooties, p. 328 - 345, 2008.
- MARIANELLI, C.; CIUCHINI, F.; TARANTINO, M.; et al. Genetic Bases of the Rifampin Resistance Phenotype in *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*, p. 5439–5443, 2004.
- MARTIN, F. A.; POSADAS, D. M.; CARRICA, M. C.; et al. Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. *J Bacteriol*, p. 2530–2540, 2009.
- MARTÍNEZ, C. M.; JIMÉNEZ, A. P.; BLANCO, M. C. et al. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalusia (Spain), January – March 2002. *Eurosurveillance*, v. 8, n. 7-8, p. 164-8, 2003.
- MARTIN-MAZUELOS, E.; NOGALES, M. C.; FLOREZ, C. et al. Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.8, p. 2035-6, 1994.
- McCAUGHEY, W. J.; PURCELL, D. A. Brucellosis in bull. *Vet. Rec.*, v. 93, p. 336-337, 1973.
- MCCORQUODALE, S. M., DIGIACOMO, R. F. The role of wild american ungulates in the epidemiology of bovine brucellosis: a review. *J Wildl Dis*, v. 21, n. 4, p 351-357, 1985.
- MCDONALD, W. L., JAMALUDIN, R., MACKERETH, G. et al. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 12, p. 4363-4370, 2006.
- MENDONÇA, C. A. S. Pesquisa de soropositividade para diagnóstico de brucelose em grupos ocupacionais do município de Garanhuns-PE, submetidos às provas de soroprecipitação rápida (SAR) e Antígeno tamponado acidificado (ATA). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRPE, 7., 1997, Recife. *Resumo*. Recife: UFRPE, 1997, p.369.
- METHODS for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006. (CLSI documento M45-A)

- MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MINHARRO, S.; et al. Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT? *Leite Integral*, v. 3, p. 44-55, 2008.
- MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; REGUERA, J. M. Posttreatment Follow-Up of Brucellosis by PCR Assay. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 12, p. 4163-4166, 1999.
- MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; REGUERA, J. M. Diagnostic Yield of a PCR Assay in Focal Complications of Brucellosis. *J Clin Microbiol*, v. 39, n. 10, p. 3743-3746, 2001.
- MORENO, E. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.31-38, 2002.
- MORITA, Y.; SOBEL, M. L.; POOLE, K. "Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product". *Antimicrob Agents Chemother*, v. 188, n. 5, p. 1847-55, 2006.
- NAVARRO, E.; CASAO, M. A.; SOLERA, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 4, n. 1, p. 115-123, 2004.
- NAVARRO-MARTÍNEZ, A.; SOLERA, J.; CORREDOIRA, J.; et al. Epididymo-orchitis due to *Brucella melitensis*: A retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis*, v. 33, p. 2017-22, 2001.
- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv Vet Sci Comp Med*, v.24, p.69-98., 1980.
- NICOLETTI, P. A short story of brucellosis. *Vet Microbiol*, v.90, n. 1-4, p.5-9, 2002.
- NICOLETTI, P. Epidemiology in brucellosis. Brucellosis 2005, Proceedings International Research Conference including the 58<sup>th</sup> Brucellosis Research Conference, Mérida, Yucatan, México, October, 15-19, 2005.
- OLSEN, S. C.; STOFFREGEN, W. S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev Vaccines*. v. 4, n. 6, p.915-28, 2005.
- OSTERMAN, B.; MORIYÓN, I. International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*, Minutes of the meeting, 17 September, 2003, Pamplona, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 56, p. 1173-1175, 2006.
- OZBAY, K.; INANMIS, R. A. Successful treatment of brucellosis in a twin pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol*, v. 33, n. 1, p. 61-2, 2006.
- PAPPAS, G.; BOSILKOVSKI, M.; AKRITIDIS, N. et al. Brucellosis and the respiratory system. *Clin Infect Dis*, v. 37, n. 7, p. 95-9, 2003.
- PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N.; BOSILKOVSKI, M. et al. Brucellosis. *N Engl J Med*, v. 352, n. 22, p. 2325-36, 2005.
- PAPPAS, G.; PANAGOPOULOU, P.; CHRISTOU, L. et al. *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* v.63, p. 2229-2236, 2006.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N. et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet. Infect. Dis.*, v. 6, p. 91-99, 2006.
- PERFORMANCE Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008. (CLSI documento M100-S18)
- PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. *Medicina Interna*, v. 10, n.2, p. 91-100, 2003.
- POESTER, F. P.; GONÇALVES V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol*, v. 90, n. 1-4, p.55-62, 2002.

- POESTER, F. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, supl. 1, p.1-5, 2009.
- QADRI, S. M.; HALIM, M. A.; UENO, Y. et al. Antibacterial activity of azithromycin against *Brucella melitensis*. *Chemother*, v. 41, n. 4, p. 253-256, 1995.
- RADOLF, J. D. Southwestern Internal Medicine Conference: Brucellosis: Don't let it get your goat! *Am J Med Sci*, v.307, p. 64-75, 1994.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 692p.
- RANKIN, J. E. F. *Brucella abortus* in bull: a study of twelve naturally-infected cases. *Vet. Rec.*, v. 77, p. 132-135, 1965.
- REGUERA, J. M.; ALARCON, A.; MIRALLES, F. et al. *Brucella* endocarditis: clinical, diagnostic and therapeutic approach. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 22, n. 11, p. 647-50, 2003.
- RICHMOND, J. Y.; MCKINNEY, R. W. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 3 ed. Washington: National Institutes of Health/Centers for disease control and prevention. p. 85-86, 1993.
- ROBISON-DUNN, B. The microbiology laboratory's role in response to bioterrorism. *Arch Pathol Lab Med*, v. 126, n. 3, p. 291-4, 2002.
- ROTZ, L. D.; KOO, D.; O'CARROLL, P. W. et al. Bioterrorism preparedness: planning for the future. *J Public Health Manag Pract*, v. 6, n. 4, p.45-49, 2000.
- ROTZ, L. D.; KHAN, A. S.; LILLIBRIDGE, S. R. et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis*, v. 8, n. 2, p. 225-230, 2002.
- RUBINSTEIN, E.; LANG, R.; SHASHA, B. et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, n. 9, p. 1925-1927, 1991.
- RUSSEL, A. D.; KOULIKOVSKII, A. V. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases. Geneva: WHO, 1984, 61p.
- SANCHEZ-SOUSA, A.; TORRE, C.; CAMPELLO, M. G.; et al. Serological diagnosis of neurobrucellosis. *J Clin Pathol*, v. 43, n. 1, p. 79-81, 1990.
- SANTOS, R. L.; SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A. et al. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cad Tec Vet Zoot*, n.47, p.83-98, 2005.
- SCHEIN, F. B. Prevalência de Brucelose no Rebanho Bovino Leiteiro e na Família Rural do Município de Araputanga – MT. 2006. 87p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.
- SCHLABRITZ – LOITSEVITCH, N. E.; WHATMORE, A. M.; QUANCE, C. R. et al. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report. *J Med Primatol*, v.38, n. 1, p. 70-73, 2009.
- SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLAČEK, I. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 58, p. 375–382, 2008.
- SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009.
- SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M. et al. Brucelose Bovina. *Cad Tec Vet Zoot*, n.47, p.1-12, 2005.
- SKALSKY, K.; YAHAV, D.; BISHARA, J. et al. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, v. 336, n. 7646, p. 701-4, 2008.



- SOHN, A. H.; PROBERT, W. S.; GLASER, C. A. et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis*, v. 9, n. 4, p. 485-488, 2003.
- SOLERA, J.; MARTINEZ-ALFARO, E.; ESPINOSA, A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs*, v. 53, n. 2, p. 245-56, 1997.
- SOLERA, J.; MARTINEZ-ALFANO, E.; ESPINOZA, A.; et al. Multivariate model for predicting relapse in human brucellosis. *J Infect Dis*, v. 36, p. 85-92, 1998.
- SOUSA, J. C. Antibióticos antibacterianos. Publicações Farmácia Portuguesa, Associação Nacional de Farmácias 1ª Ed. 2001.
- SPRATT, B. G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, v. 264, p. 388-393, 1994.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. 180p.
- THOEN, C. O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N. F. *Brucella*. In: Gyles, C. L.; Thoen, C. O. (Ed.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. p. 236-247.
- TILLER, R.V.; GEE, J.E.; LONSWAY, D.R.; et al.(2010). Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52-year old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiol*, v. 27, n. 1, p.23, 2010.
- TURKMANI, A.; IOANNIDIS, A.; CHRISTIDOU, A. et al. In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v. 5, p.24, 2006.
- VASCONCELOS, C. G. C. *Zoonoses ocupacionais: inquérito soro-epidemiológico em estudantes de medicina veterinária, e análise de risco para Leptospirose, Brucelose e Toxoplasmose*. 2003. 108p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- VERONESI, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 421, 1976.
- WALSH, C. *Antibiotics: action, origins, resistance*. Washington, DC: ASM PRESS, 2003.
- YAGUPSKY, P.; BARON, E. J. Laboratory exposures to *Brucellae* and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis*, v.11, n. 8, 2005.
- YAMAZHAM, T.; AYDEMIR, S.; TUNGER, A. et al. In vitro activities of various antimicrobials against *Brucella melitensis* strains in the Aegean region in Turkey. *Med Princ Pract*, v. 14, n. 6, p. 413-416, 2005.
- YOUNG, E. J. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*, v.21, n.2, p.283-290, 1995.
- YOUNG, E. J. Brucellosis: current epidemiology, diagnosis, and management. *Cur Clin Top Infect Dis*, v. 15, p. 115-128, 1995.

## **CAPÍTULO 2**

### **SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *BRUCELLA ABORTUS* A AGENTES ANTIMICROBIANOS**

## RESUMO

A brucelose bovina é uma zoonose de distribuição mundial, que acarreta problemas sanitários e prejuízos significativos. A infecção humana ocorre pelo consumo de leite ou derivados não pasteurizados contaminados e pelo contato com material de aborto de animais infectados. Para o sucesso da terapia no homem, o início precoce e a escolha correta do antimicrobiano são fundamentais. O perfil de susceptibilidade de 150 amostras de *Brucella abortus* isoladas de bovinos originados dos estados de Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins foi determinado pelo método de diluição em ágar para oito antimicrobianos: amicacina, ciprofloxacina, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, ofloxacina, rifampicina e sulfametoxazol + trimetoprim. Cada antimicrobiano foi testado em 12 diferentes concentrações, de 0,06 a 128 µg/mL. Foram realizadas provas bioquímicas e análises genotípicas através do MLVA16 com o objetivo de identificar possíveis relações entre o perfil de susceptibilidade, biótipo, genótipo e origem das amostras. Dentre as amostras testadas, 100% foram sensíveis a doxiciclina e a ofloxacina. Apenas uma (0,66%) amostra apresentou resistência à ciprofloxacina, duas (1,33%) amostras foram resistentes à estreptomicina, duas (1,33%) resistentes à sulfametoxazol + trimetoprim e cinco (3,33%) resistentes à gentamicina. Para a rifampicina foram encontradas três (2%) amostras resistentes e 54 (36%) com perfil intermediário. Dentre as nove amostras resistentes, 4 de Minas Gerais, 3 do Pará e 2 do Rio Grande do Sul, duas foram consideradas multirresistentes por terem apresentado resistência a mais de uma classe de antimicrobianos. Não foi verificada uma interação entre o perfil das amostras e sua origem, biotipagem e genotipagem.

**Palavras-chave:** *Brucella abortus*, concentração inibitória mínima, Brasil.

## ABSTRACT

*Bovine brucellosis is a zoonosis of worldwide distribution, which causes health problems and significant losses. Human infection occurs through the consumption of milk or unpasteurized products and contact with abortion material from infected animals. For the success of therapy in humans, the early and correct choice of antimicrobial is essential. The susceptibility profile of 150 samples of Brucella abortus isolated from cattle originating from the states of Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo and Tocantins was determined by agar dilution to eight antibiotics: amikacin, ciprofloxacin, doxycycline, streptomycin, gentamicin, ofloxacin, rifampin and sulfamethoxazole-trimethoprim. Each drug was tested in 12 different concentrations, from 0.06 to 128 mg / mL. Biochemical tests and genotypic analysis by MLVA16 were performed in order to identify possible relationships between the susceptibility profile, biotype, genotype and origin of the samples. Among the samples tested, 100% were sensitive to doxycycline and ofloxacin. Only one (0.66%) sample showed resistance to ciprofloxacin, two (1.33%) were resistant to streptomycin, two (1.33%) resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim and five (3.33%) resistant to gentamicin. For rifampicin were found three (2%) resistant strains and 54 (36%) with intermediate profile. Among the nine resistant strains, 4 of Minas Gerais, 3 of Para and 2 of Rio Grande do Sul, two were considered multidrug resistant because they presented resistance to more than one class of antimicrobials. There was no interaction between the profile of the samples and their origin, biotyping and genotyping.*

**Keywords:** *Brucella abortus*, minimum inhibitory concentration, Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella*, que infectam animais e o homem. Nos bovinos, a brucelose é causada por *Brucella abortus*. Por ser uma zoonose de distribuição mundial causa grande impacto econômico e para a saúde pública, sobretudo em países em desenvolvimento (Manual..., 2006).

A transmissão da brucelose bovina se faz principalmente pelo contato direto com fetos abortados, placentas e descargas uterinas infectadas, eliminadas no ambiente em grandes quantidades no momento do parto ou aborto (Enright, 1990). O hábito dos bovinos de lambem e cheirar animais recém-nascidos, ou mesmo fetos abortados favorece esta transmissão (Nicoletti, 1980; Silva et al., 2005).

O homem pode ser infectado pela manipulação de material de aborto ou parto e de carcaças de animais infectados ou de fômites contaminados. Outras importantes fontes de contaminação para a população em geral são a ingestão de leite cru ou de produtos lácteos contaminados por *Brucella* spp. e não submetidos a tratamento térmico (Acha e Szyfres, 2003).

No Brasil, as informações sobre a brucelose humana embora escassas indicam a ocorrência da doença em diversas partes do país e em diferentes grupos ocupacionais, uma vez que profissionais que trabalham em contato direto com animais têm maior risco de contrair a doença (Souza et al., 1977; Santos-Neto et al., 1999; Santos et al., 2007; Ramos et al., 2008; Tenório et al., 2008). O médico veterinário, criadores e vacinadores, além da exposição a material resultante de abortos e secreções de animais infectados, forma mais comum de contágio para os grupos de risco (Mahajan et al., 1986), também podem ser contaminados acidentalmente pelas amostras vacinais (Berkelman, 2003). Os funcionários de abatedouros também fazem parte do grupo de risco, pois além de trabalharem em contato direto com

carcaças, o ambiente do abatedouro favorece a grande formação de aerossóis que podem transmitir o agente (Barbuddhe et al., 2000).

As principais manifestações clínicas da brucelose bovina, doença causada pela *B. abortus*, são o aborto no terço final da gestação, retenção de placenta e nascimento de bezerros fracos, fatores que contribuem para uma considerável queda na produção de leite e carne em rebanhos afetados. A ocorrência primária da doença nos animais, especialmente nos bovinos, é um dos principais fatores de risco da brucelose humana (Radostits et al., 2002).

No homem, a brucelose pode apresentar um início agudo, com febre ondulante, sudorese profusa, fadiga, anorexia, perda de peso, entre outros e uma fase crônica, na qual as principais manifestações são o desenvolvimento de endocardite, artrite e osteomielite. Como a sintomatologia da doença no homem é bastante inespecífica é importante que o médico seja informado sobre a possibilidade da doença nos casos em que o paciente faz parte de grupos de risco e que possa ter sido exposto ao agente (Pessegueiro et al., 2003).

O tratamento da brucelose no homem é prolongado e deve ser iniciado o mais cedo possível, por ser mais efetivo nos casos agudos. Nos casos crônicos da doença, o tratamento é geralmente pouco eficaz (Corbel et al., 2006). O tratamento da brucelose requer um regime combinado de antibióticos e está condicionado ao fato da *Brucella* spp. ser um patógeno intracelular. Assim, drogas com uma boa capacidade de penetrar nas células infectadas são necessárias no tratamento da brucelose humana. Para que a terapia no homem seja bem sucedida, a escolha correta do antimicrobiano e o reconhecimento precoce da doença são essenciais.

A resistência antimicrobiana é uma preocupação global para a saúde pública e animal e é influenciada tanto pelo uso humano quanto animal e vegetal dos

antimicrobianos. As consequências desta resistência são particularmente importantes quando os patógenos são resistentes aos antimicrobianos que são extremamente importantes no tratamento de doenças humanas (OIE..., 2007). O aparecimento de resistência aos antimicrobianos ocorre em função de diversos fatores como o diagnóstico falho das doenças infecciosas, utilização de antibióticos de amplo espectro em detrimento daqueles de menor espectro que tratam doenças específicas, falta de programas educativos e de informação adequada, utilização inadequada dos antibióticos (dose, via de administração, tempo de tratamento) (Antimicrobial..., 2002; Cunha, 2003). Assim, a probabilidade das bactérias e de outros micróbios de se adaptarem e reproduzirem na presença de alguns antimicrobianos, ao invés de terem seu crescimento inibido, é bastante intensificada (Antimicrobial..., 2002).

De uma forma geral, as principais consequências e implicações clínicas da resistência bacteriana aos antibióticos são a necessidade frequente de hospitalização, o prolongamento do internamento hospitalar, o aumento da mortalidade e a necessidade de utilização de fármacos alternativos mais caros e mais tóxicos. Assim, as estratégias de controle de resistência aos antimicrobianos são de primordial importância para uma adequada prestação de cuidados a saúde (Cunha, 2003). O controle da resistência bacteriana aos antibióticos está diretamente relacionado a estratégias que se aplicam tanto a nível comunitário como hospitalar, como a utilização otimizada dos antibióticos, os programas eficazes de controle da infecção e a vigilância epidemiológica. Um plano de prevenção de resistência deverá incluir um programa de vigilância ativa das resistências, um programa ativo e eficaz de controle da infecção, para minimizar a disseminação de resistência, e um programa eficaz de utilização dos antimicrobianos (Silvestre et al, 1998). Os setores da saúde humana, animal e vegetal têm uma responsabilidade partilhada, para prevenir ou minimizar as pressões de seleção da resistência antimicrobiana em

patógenos humanos e não humanos (OIE..., 2007).

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) pode ser utilizada como uma medida comparativa da atividade antimicrobiana contra um patógeno específico. Os resultados podem ser categorizados como “sensível”, “intermediário” ou “resistente” a um determinado agente antimicrobiano com base no MIC. A determinação acurada do MIC por testes de sensibilidade aos antimicrobianos e a vigilância continuada são estratégias imprescindíveis para avaliar e monitorar amostras isoladas uma vez que evidenciam tendências de evolução temporal da susceptibilidade de cada espécie, e com isso, auxiliam na escolha da terapia (Gould, 2008).

Os valores de MIC permitem analisar as concentrações necessárias para um antimicrobiano eliminar com eficiência um microrganismo. Estes valores de concentração são de extrema importância para a escolha de um antimicrobiano adequado, pois permite constatar se a dose necessária de um antimicrobiano para ser obtida uma boa atividade bactericida ou bacteriostática pode ser administrada com segurança.

A determinação do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de *Brucella abortus* é importante pelo fato deste permitir a identificação de drogas para as quais o microrganismo é sensível, possibilitando o emprego destas no tratamento da brucelose. O conhecimento de antibacterianos para os quais *Brucella* spp. são resistentes também é importante, pois esta informação pode ser usada na criação de meios de cultura mais seletivos para o isolamento do agente por laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. Praticamente não há dados na literatura a respeito da susceptibilidade de *B. abortus* a antimicrobianos e este dado é de grande importância, já que há muitos relatos de brucelose humana no Brasil relacionados a esta espécie de *Brucella* (Souza et al., 1977; Santos-Neto et al., 1999; Santos e Teixeira, 2007; Ramos et al., 2008; Tenório et al., 2008). Vale ressaltar que os

antimicrobianos mais utilizados no tratamento da brucelose humana são as tetraciclínas, os aminoglicosídeos, a rifampicina, o cotrimoxazol (sulfametoxazol + trimetoprim), as quinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração (Pessegueiro et al., 2003), justificando a escolha de antimicrobianos pertencentes a estas classes em nosso estudo. Outras ferramentas importantes usadas para a caracterização de amostras de *B. abortus* são a biotipagem e a genotipagem. A biotipagem serve para determinar se um grupo de microrganismos de uma mesma espécie provém de uma fonte comum ou de fontes distintas, é uma técnica laboratorial, realizada por provas bioquímicas e que envolve a manipulação do microrganismo vivo (Alton et al., 1988). A genotipificação é uma técnica que envolve a análise direta do DNA, permitindo grandes avanços na identificação, classificação, diagnóstico e nos estudos de evolução e filogenia de microrganismos (Vergnaud e Pourcel, 2006). A identificação de possíveis padrões de agrupamentos e de distribuição das amostras no país fornece informações imprescindíveis para o entendimento epidemiológico da brucelose (Minharro, 2009).

O conhecimento do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Brucella* spp. tem grande relevância clínica nos casos de brucelose humana, pois direciona o tratamento quanto ao uso do antimicrobiano ou de possíveis combinações de acordo com as características genotípicas e fenotípicas das amostras e sua região de origem.

O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de susceptibilidade de amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil, entre 1977 e 2009, aos agentes antimicrobianos mais comumente utilizados para o tratamento da brucelose humana e verificar a existência de relação entre o perfil de susceptibilidade das amostras com sua origem, biotipificação e genotipificação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Amostras

Foram utilizadas 150 amostras de *Brucella abortus*, isoladas de bovinos no Brasil, no período de 1977 a 2009. As amostras foram provenientes de animais dos estados de Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins, sendo que 137 amostras foram descritas por Minharro (2009), 10 amostras isoladas e identificadas no Laboratório de Bacteriologia Aplicada (LBA) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG e 3 amostras de referência de *Brucella abortus* (544 ATCC 23448<sup>T</sup>, amostra vacinal B19 BCCN V1 e ATCC 2308).

### 2.2. Identificação das Amostras

Todas as amostras de *B. abortus* foram manipuladas no Laboratório de Biossegurança nível 3 da Escola de Veterinária da UFMG e caracterizadas pelas provas de catalase, oxidase, urease, citrato e redução de nitrato (Mac Faddin, 1980; Alton et. al, 1988; OIE, 2007). A confirmação das espécies e biovars de *B. abortus* foi determinada pelo crescimento em atmosfera de CO<sub>2</sub>, aglutinação com acriflavina, produção de H<sub>2</sub>S, crescimento na presença de tionina (20 µg/mL e 40 µg/mL) e fucsina básica (20 µg/mL) e aglutinação frente aos soros anti-A, anti-M e anti-R (Cepanzo - Argentina) (Alton et. al, 1988; Manual..., 2008). A identificação genotípica das amostras foi realizada pela PCR específica para o gênero (Baily et al., 1992) e PCR AMOS enhanced (Bricker e Halling, 1995). Os microrganismos foram mantidos a -80°C em caldo BHI acrescido de 20% de glicerol até a realização dos testes.

### 2.3. Genotipificação

O perfil genotípico das amostras foi determinado pela técnica de análise de múltiplos loci com VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) (MLVA typing) (Le Flèche et al., 2006; Al-Dahouk et al., 2007) descrito por Minharro (2009). A análise dos

genótipos foi feita a partir da imagem digital de cada gel, o tamanho das bandas foi estimado com o auxílio do programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Bélgica). O tamanho estimado das bandas foi convertido em número de unidades de seqüências de repetições (*tandem repeat*) dos nucleotídeos para cada lócus (Le Flèche et al., 2006). Os genótipos obtidos foram comparados aos depositados no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.upsud.fr/MLVAnet>).

## 2.4. Determinação da Sensibilidade aos Antimicrobianos

### 2.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi realizada segundo as recomendações do manual do CLSI M45-A (Methods..., 2006). As amostras bacterianas foram crescidas em ágar triptose (Difco, Detroit, USA) por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação as bactérias foram suspensas em PBS estéril (pH 7,2) em uma concentração equivalente à escala 0,5 de Mac Farland, conferida em espectrofotômetro. As suspensões foram transferidas para os poços do repicador de Steers e posteriormente inoculadas em placas contendo ágar Mueller Hinton (Difco, Detroit, USA) acrescido dos antimicrobianos nas concentrações testadas. As placas com os antimicrobianos eram preparadas no dia anterior ao da inoculação e conservadas em geladeira (2 – 4°C) até o uso. Após inoculação das placas com as suspensões bacterianas, elas foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 horas, quando foi realizada a leitura dos resultados. Foram testados os antimicrobianos amicacina (Eurofarma, São Paulo, Brasil), ciprofloxacina (DEG, Hong Kong, China), doxiciclina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), estreptomomicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), gentamicina (Galena, China), ofloxacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), rifampicina (Lupin, USA) e sulfametoxazol (Fluka, Saint Louis, USA) e trimetoprim (Genix, China) (19 partes de

sulfametoxazol para 1 parte de trimetoprim), em 12 concentrações de 0,06 µg/mL a 128 µg/mL.

### 2.4.2. Controle de qualidade

Todos os antibióticos foram testados com as amostras de referência: *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. pneumoniae* ATCC 49619 para garantir que os resultados obtidos estivessem dentro dos limites aceitáveis de controle de qualidade para a determinação da concentração inibitória mínima (Performance..., 2005). As amostras de referência foram mantidas a -80°C em caldo BHI acrescido de 20% de glicerol até a realização dos testes.

Em todas as determinações, as amostras de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *B. abortus* 544 ATCC 23448<sup>T</sup> foram utilizadas como controles de qualidade. Além da utilização das amostras controle também foram empregadas, em cada ensaio, quatro placas de ágar Mueller-Hinton sem antibiótico, em duplicata, como controle do crescimento das amostras, sendo duas no início da seqüência de placas com antibiótico e duas ao final desta seqüência.

Os testes só eram validados quando o controle de qualidade da prova, através das amostras de referência e o controle do inóculo, através das placas sem antimicrobianos, funcionavam, garantindo assim resultados confiáveis.

### 2.4.3. Critérios interpretativos para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados da concentração inibitória mínima 50% (MIC<sub>50</sub>) e 90% (MIC<sub>90</sub>) e o intervalo dos resultados da concentração inibitória mínima foram computados para cada antimicrobiano testado. Os critérios utilizados para interpretação dos resultados da determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para as amostras de *Brucella abortus* foram os utilizados para *Brucella* spp. ou bactérias de

crescimento lento (*Haemophilus* spp.), conforme manual CLSI, documento M100-S18 (Performance..., 2008). Através destes critérios as amostras eram classificadas como resistentes ou sensíveis aos antimicrobianos testados. Sendo que para a rifampicina as amostras ainda podiam ser classificadas como de susceptibilidade intermediária.

Vale ressaltar que por não ter um ponto de corte definido para a amicacina, os resultados apresentados pelas amostras foram avaliados através do MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> e variação de MIC. Não havendo classificação das amostras como resistentes ou sensíveis a este antimicrobiano.

#### **2.4.4. Análise da relação entre resistência aos antimicrobianos, biótipo, genótipo e origem das amostras**

Todos os resultados obtidos foram tabelados e inseridos no programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Bélgica) para a determinação do perfil genotípico das amostras estudadas. A biotipagem das amostras foi realizada através de provas bioquímicas e a avaliação do perfil de susceptibilidade a partir dos critérios

interpretativos para *Brucella* spp. e para bactérias de crescimento lento, encontrados no manual CLSI (Performance..., 2008). As relações entre perfil de susceptibilidade, origem, biótipo e genótipo das amostras foram avaliadas a partir da criação de tabelas dinâmicas, nas quais os dados das amostras foram cruzados.

### **3. RESULTADOS**

A tabela 1 apresenta os valores de MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> e da variação encontrada para as 150 amostras de *B. abortus*, assim como o ponto de corte e o número de amostras resistentes para cada antimicrobiano testado. A ofloxacina e a doxiciclina foram os antimicrobianos que apresentaram melhores atividades contra as amostras de *B. abortus*, sendo 100% das amostras testadas sensíveis a estes antimicrobianos. Em seguida, tivemos a ciprofloxacina com apenas uma amostra apresentando resistência (0,66%). Os antimicrobianos que apresentaram menor atividade contra as amostras de *B. abortus* foram a rifampicina e a gentamicina, com respectivamente, 3 (2,0%) e 5 (3,33%) amostras apresentando resistência.



Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade a sete antimicrobianos de 150 isolados brasileiros de *Brucella abortus* entre os anos de 1977 e 2009.

Agente Antimicrobiano	Concentração Inibitória Mínima (µl/mL)				Resistência			
	Variação <sup>1</sup>	MIC <sub>50</sub> <sup>2</sup>		MIC <sub>90</sub> <sup>3</sup>		PC <sup>5</sup>	N	% <sup>6</sup>
		Valor	N <sup>4</sup>	Valor	N			
Amicacina	2,0 – ≥256 (8)	4,0	100	8,0	147	– <sup>7</sup>	–	–
Ciprofloxacina	0,5 – 2,0 (3)	0,5	149	0,5	149	>1,0	1	0,66
Doxiciclina	≤0,06 – 1,0 (5)	0,5	136	0,5	136	>1,0	0	0
Estreptomicina	0,125 – ≥256 (12)	1,0	144	1,0	144	>16	2	1,33
Gentamicina	0,25 – ≥256 (11)	2,0	144	2,0	144	>4,0	5	3,31
Ofloxacina	0,5 – 1,0 (2)	0,5	145	0,5	145	>2,0	0	0
Rifampicina	0,125 – 8,0 (7)	1,0	93	2,0	147	≥4,0 <sup>8</sup>	3 <sup>9</sup>	2,00 <sub>10</sub>
Sulfametoxazol/ trimetoprim	0,1/1,9 12,8/243,2 (8)	0,8 / 15,2	137	0,8 / 15,2	137	>2/38	2	1,33

1 – Variação de MIC e (número de variações de diluição) para cada antimicrobiano; 2 – MIC<sub>50</sub> – Concentração Inibitória Mínima 50%; 3 – MIC<sub>90</sub> – Concentração Inibitória Mínima 90%; 4 – N – número de amostras sensíveis no MIC estabelecido; 5 – Ponto de corte de resistência para as amostras de *Brucella* spp. (µl/mL); 6 - % - Percentagem de amostras resistentes; 7 – Não há ponto de corte definido para amicacina para *Brucella* spp. ou bactérias fastidiosas pelo CLSI; 8 – Os pontos de corte para rifampicina são: resistência ≥ 4,0 µl/mL, intermediário 2,0 µl/mL e sensibilidade ≤ 1,0 µl/mL; 9 – O número de amostras encontradas com valores intermediários de resistência para a rifampicina foi de 54; 10 – A percentagem encontrada de amostras com valores intermediários de resistência para a rifampicina foi de 36%.

Os resultados indicados na Tabela 2 mostram o perfil de susceptibilidade das amostras de *B. abortus* a sete antimicrobianos. Esta classificação das amostras em perfis de susceptibilidade foi criada especificamente para o estudo com o intuito de agrupar amostras que apresentavam susceptibilidades semelhantes aos antimicrobianos testados, facilitando assim a visualização do número de amostras resistentes, sensíveis e intermediárias. Foram consideradas multirresistentes as amostras que apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano de classes diferente. Observa-se que duas das amostras de *B. abortus* testadas (1,33%) apresentaram multirresistência (perfis F e G), sendo a amostra de perfil F resistente a um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos (estreptomicina) e a um da classe das sulfonamidas (sulfametoxazol

+ trimetoprim) e a de perfil G resistente um antimicrobiano da classe das quinolonas (ciprofloxacina), dois da classe dos aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina) e um da classe das sulfonamidas (sulfametoxazol + trimetoprim).

Através deste perfil foi possível verificarmos que 60% das amostras estudadas (90/150) foram susceptíveis a sete antimicrobianos estudados (perfil A), 34% das amostras (51/150) foram susceptíveis a seis antimicrobianos e apresentaram perfil intermediário à rifampicina (perfil B) e os 6% de amostras restantes (9/150) apresentaram resistência a um ou mais dos antimicrobianos testados (perfis C, D, E, F e G). Os perfis F e G correspondem à susceptibilidade das amostras multirresistentes.

Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade a sete antimicrobianos de 150 isolados brasileiros de *Brucella abortus* entre 1977 e 2009 – segundo o CLSI (Performance..., 2008).

CIP	Antibióticos <sup>1</sup>						Perfil <sup>2</sup>	N <sup>3</sup>
	DOX	EST	GEN	OFX	RIF	SXT		
S <sup>4</sup>	S	S	S	S	S	S	A	90
S	S	S	S	S	I <sup>5</sup>	S	B	51
S	S	S	S	S	R <sup>6</sup>	S	C	03
S	S	S	R	S	S	S	D	03
S	S	S	R	S	I	S	E	01
S	S	R	S	S	I	R	F	01
R	S	R	R	S	I	R	G	01

1 – CIP: ciprofloxacina, DOX: doxiciclina, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, OFX: ofloxacina, RIF: rifampicina, SXT: sulfametoxazol/trimetoprim; 2 – Perfis de susceptibilidade aos oito antimicrobianos testados 3 - N – número de amostras com o mesmo perfil de susceptibilidade; 4 – susceptível; 5- intermediário; 6 – resistente.

A tabela 3 apresenta o perfil de susceptibilidade das amostras de acordo com sua origem, mostrando que das 46 (30,6%) amostras do estado de Minas Gerais (MG) quatro apresentaram resistência a um dos antimicrobianos testados e doze amostras apresentaram perfil intermediário à rifampicina. Dentre as quatro amostras resistentes estão as duas amostras multirresistentes encontradas.

Das 31 (20,6%) amostras originadas do estado do Pará (PA), foram encontradas três amostras resistentes a um dos antimicrobianos e quatro amostras com perfil intermediário de resistência à rifampicina.

Já no estado do Rio Grande do Sul (RS), de um total de 32 (21,3%) amostras isoladas duas foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos e dezenove apresentaram perfil intermediário de resistência à rifampicina.

A avaliação dos perfis de susceptibilidade das amostras isoladas dos estados de Santa Catarina (SC), São Paulo (SP) e Tocantins (TO) mostra que em nenhum destes estados foram encontradas amostras resistentes aos antimicrobianos testados, porém cinco (5/8) amostras isoladas do estado de Santa Catarina, doze (12/15) do estado de São Paulo e duas (2/15) do estado do Tocantins apresentaram perfil de resistência intermediário à rifampicina.

Tabela 3 - Perfil de susceptibilidade a sete antimicrobianos de isolados brasileiros de *Brucella abortus*, agrupados por Estado, segundo o CLSI (Performance..., 2008).

Estado <sup>1</sup>		Perfil <sup>2</sup>	Antibióticos <sup>3</sup>							N <sup>4</sup>
Local	N		CIP	DOX	EST	GEN	OFX	RIF	SXT	
MG	46	A	S <sup>5</sup>	S	S	S	S	S	S	33
		B	S	S	S	S	S	I <sup>6</sup>	S	09
		C	S	S	S	S	S	R <sup>7</sup>	S	01
		E	S	S	S	R	S	I	S	01
		F	S	S	R	S	S	I	R	01
		G	R	S	R	R	S	I	R	01
PA	31	A	S	S	S	S	S	S	S	24
		B	S	S	S	S	S	I	S	04
		C	S	S	S	S	S	R	S	01
		D	S	S	S	R	S	S	S	02
RS	32	A	S	S	S	S	S	S	S	11
		B	S	S	S	S	S	I	S	19
		C	S	S	S	S	S	R	S	01
		D	S	S	S	R	S	S	S	01
SC	08	A	S	S	S	S	S	S	S	03
		B	S	S	S	S	S	I	S	05
SP	15	A	S	S	S	S	S	S	S	03
		B	S	S	S	S	S	I	S	12
TO	15	A	S	S	S	S	S	S	S	13
		B	S	S	S	S	S	I	S	02
REF <sup>8</sup>	03	A	S	S	S	S	S	S	S	03

1 – Estados – MG: Minas Gerais; PA: Pará; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo; TO: Tocantins; 2- Perfil de Susceptibilidade aos oito antimicrobianos testados; 3 - CIP: ciprofloxacina, DOX: doxiciclina, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, OFX: ofloxacina, RIF: rifampicina, SXT: sulfametoxazol/trimetoprim; 4- N – número de amostras com o mesmo perfil de susceptibilidade; 5- susceptível; 6 – intermediário; 7- resistente; 8 - amostras de referência de *B. abortus*.

Das 150 amostras de *B. abortus* estudadas, nove (6,0%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo 4 amostras originadas do estado de Minas Gerais, 2 do estado do Rio Grande do Sul e 3 do estado do Pará. A distribuição destas amostras com relação à origem, perfil, biotipificação e genotipificação (MLVA-16) está representada na Tabela 4. Duas destas nove amostras foram resistentes a mais de

uma classe de antimicrobiano, ou seja, apresentaram multirresistência aos antimicrobianos testados. Estas duas amostras são originadas do estado de Minas Gerais, foram tipificadas como *B. abortus* biovar 1 e pertencentes aos genótipos 28 (painel1), 33 (painel 2A), 2B4 e 2B46 (painel 2B) e D e K (MLVA-16) (Le Flèche et al., 2006; Al-Dahouk et al., 2007; Minharro, 2009).

Tabela 4 - Origem, perfil, biotipificação e genotipificação pelo MLVA-16 (Le Flèche et al., 2006; Al-Dahouk et al., 2007; Minharro, 2009) das nove amostras de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil que apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados.

Estado <sup>1</sup>	Perfil <sup>2</sup>	Biovar <sup>3</sup>	MLVA <sup>4</sup>				Total <sup>8</sup>
			Painel 1 <sup>5</sup>	Painel 2A <sup>6</sup>	Painel 2B <sup>7</sup>	MLVA16	
MG	C	Ba1	28	2A7	2B48	DE	04
	G	Ba1	28	33	2B4	D	
	F	Ba1	28	33	2B46	K	
	E	Ba6	40	2A4	2B8	AO	
RS	C	Ba2	28	2A3	91	AM	02
	D	Ba1	28	34	53	CH	
PA	C	Ba3	40	32	2B17	AC	03
	D	Ba3	40	30	2B3	C	
	D	Ba3	40	30	2B18	BB	

1 – MG – Minas Gerais, RS – Rio Grande do Sul, PA – Pará; 2 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos definido neste estudo; 3 – Ba1 - *Brucella abortus* biovariedade 1, Ba2 - *Brucella abortus* biovariedade 2, Ba3 - *Brucella abortus* biovariedade 3, Ba6 - *Brucella abortus* biovariedade 6; 4 – MLVA – Multi loci VNTR analysis segundo Flèche et al. (2006); Al-Dahouk et al. (2007); 5 – Painel 1 – Compostos pelos *loci* Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55; 6 – Painel 2A – Compostos pelos *loci* Bruce18, Bruce19e Bruce21; 7 – Painel 2B – Compostos pelos *loci* Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 e Bruce30. A descrição dos perfis genotípicos se encontra em <http://minisatellites.upsud.fr/MLVAnet> e Minharro (2009); 8 – Total de amostras resistentes aos antimicrobianos por estado.

#### 4. DISCUSSÃO

A determinação do perfil de susceptibilidade de amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil aos antimicrobianos frequentemente usados no tratamento de infecções por *Brucella* spp. tem grande relevância clínica, pois mostrou que a maior parte das amostras é sensível aos antimicrobianos sugeridos para o tratamento da brucelose humana. Além disso, os dados sobre sensibilidade de *B. abortus* reportados na literatura são escassos, pois na maioria dos casos só o perfil de resistência de amostras de *B. melitensis* é relatado. Como no Brasil *B. melitensis* é exótica (Poester et al., 2002) e a grande parte dos casos de brucelose humana são relacionados a *B. abortus* (Souza et al., 1977; Santos-Neto et al., 1999; Santos et al., 2007; Ramos et al., 2008; Tenório et al., 2008) os achados do presente estudo podem direcionar o tratamento de pacientes que fazem parte do grupo de risco da doença, como magarefes, trabalhadores rurais, vacinadores e médicos veterinários (Santos et al., 2007; Ramos et al., 2008; Tenório et al., 2008).

Analisando os resultados encontrados neste estudo (Tabela 1) verificamos que a amplitude de variação de resultados dos isolados para os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina e principalmente, gentamicina e estreptomicina), da classe das sulfonamidas e trimetoprima (sulfametoxazol + trimetoprim) e da classe das rifamicinas (rifampicina) é bastante ampla. Isto indica que para estes antimicrobianos existem isolados que se distanciam da variação média encontrada. Já para os antimicrobianos da classe das quinolonas (ciprofloxacina e ofloxacina) esta amplitude de variação foi bem menor, mostrando que para estes antimicrobianos os isolados apresentaram-se mais próximos da variação média encontrada. Esta variação de amplitude de resultados indica um comportamento diferente dos isolados de *B. abortus* a diferentes classes de antimicrobianos, podendo sugerir um início de adaptação ou resistência destes isolados

aos antimicrobianos pertencentes às classes a que eles se distanciam mais de uma média de resultados de MIC. Se analisarmos os dados com atenção, verificamos que a maior parte das amostras resistentes encontradas neste estudo é resistente aos antimicrobianos que apresentaram maior amplitude de variação. A doxiciclina apresentou uma amplitude de variação intermediária, porém não foi encontrada nenhuma amostra resistente a este antimicrobiano.

Na tabela 1, ainda podemos observar que os isolados testados apresentaram MIC50 e MIC90 semelhantes para os antimicrobianos: ciprofloxacina, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, ofloxacina e sulfametoxazol + trimetoprim, indicando a existência de populações homogêneas, já que para inibir o crescimento de 50 ou 90% da população estudada é necessária uma mesma concentração destes antimicrobianos. Para os antimicrobianos: amicacina e rifampicina a distância entre o MIC50 e MIC90 foi de uma diluição, ou seja, para inibir 50% das amostras são necessários 4,0 µg/mL de amicacina e 1,0 µg/mL de rifampicina, já para inibir 90% das amostras são necessários 8,0 µg/mL de amicacina e 2,0 µg/mL de rifampicina.

Pode ser constatado em nosso estudo que 6,66% (10/150) das amostras de *B. abortus* foram inibidas por uma concentração de sulfametoxazol + trimetoprim bem próxima ao ponto de corte estabelecido para este antimicrobiano, este fato pode indicar uma tendência destes isolados a resistência. Para a rifampicina também foi observada esta mesma tendência já que 36% das amostras (54/150) apresentaram perfil de susceptibilidade intermediário (MIC = 2,0 µl/ml).

Comparando os resultados de variação da concentração inibitória mínima e de MIC90 encontrados em nosso estudo com o que já foi relatado em outros países para a susceptibilidade de amostras de *Brucella* spp. aos antimicrobianos (García-Rodríguez et al., 1993; García-Rodríguez et al., 1995; Trujillano-Martín et al., 1999; Kocagöz et al.,

2002; Yamazhan et al., 2005), observamos que muitos deles são semelhantes, indicando que as amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil possuem um perfil de susceptibilidade e resistência a antimicrobianos próximo ao das amostras de *Brucella* spp. isoladas em outros lugares do mundo.

Para a classificação das amostras como resistentes, intermediárias ou sensíveis a cada um dos antimicrobianos testados foi utilizado um ponto de corte, previamente estabelecido pelo manual M100-S18 do CLSI (Performance..., 2008). Os resultados determinados pelo MIC para cada amostra foram avaliados conforme os critérios interpretativos para *Brucella* spp., como no caso da gentamicina, estreptomicina, doxiciclina e da associação sulfametoxazol + trimetoprim, e para os antimicrobianos que não tem um ponto de corte estabelecido especificamente para o gênero *Brucella* (ciprofloxacina, ofloxacina e rifampicina) foram utilizados os critérios interpretativos para bactérias fastidiosas (*Haemophilus* spp.). A rifampicina é o único dos antimicrobianos testados que apresenta pontos de corte para classificação nos três perfis citados anteriormente (resistente, intermediária ou sensível), para os outros antimicrobianos as amostras são classificadas apenas como resistentes ou sensíveis. Isto ocorre em função da baixa ocorrência de amostras resistentes para estes antimicrobianos quando se trata de amostras de *Brucella* spp. ou de bactérias fastidiosas, assim apenas um ponto de corte é definido, ou seja, a amostra que apresentar valor de MIC acima deste ponto de corte é imediatamente classificada com resistente.

A avaliação do perfil de susceptibilidade dos isolados de *B. abortus* para amicacina não pode ser realizada pelo fato de não haver um ponto de corte estabelecido para *Brucella* spp. nem para bactérias fastidiosas pelo CLSI. Porém os dados de MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> e de variação de MIC obtidos neste estudo poderão ser utilizados como base comparativa para novos estudos e também poderão ser mais bem analisados quando

um ponto de corte para este antimicrobiano for estabelecido.

O ponto de corte para a estreptomicina pode variar entre  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$  e  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$  dependendo da atmosfera de incubação (Performance..., 2008). No presente estudo foi utilizado o ponto de corte de  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ , pois as amostras de *B. abortus* foram incubadas a 37°C, por 48 horas em 5% de CO<sub>2</sub>. Segundo Alton e colaboradores (1988) as amostras de *Brucella* spp. provenientes de material de campo e estirpes laboratoriais devem ser incubadas em atmosfera contendo de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>.

As nove amostras resistentes apresentaram resistência a cinco (Tabela 1) de sete antimicrobianos, indicando que existem isolados brasileiros de *B. abortus* resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos frequentemente usados para o tratamento da brucelose humana, e que isto poderá tornar o tratamento ineficaz ou que apresente recidivas. Vale ressaltar que apenas um isolado apresentou resistência a ciprofloxacina e que este mesmo isolado foi resistente a outros três antimicrobianos (estreptomicina, gentamicina e sulfametoxazol + trimetoprim), além de ter apresentado susceptibilidade intermediária a rifampicina (perfil G). Foram encontradas duas amostras multirresistentes (perfis F e G), que foram classificadas desta forma por apresentarem resistência a mais de um antimicrobiano de diferentes classes, estas duas amostras, provavelmente, desenvolveram mecanismos de resistência diversos ou um mecanismo comum a estas drogas de classes diferentes (aminoglicosídeos, quinolonas, rifampicinas e sulfonamidas). A amostra multirresistente com perfil G foi sensível a ofloxacina, antimicrobiano pertencente à mesma classe da ciprofloxacina, ao qual foi resistente.

A bomba de efluxo é um mecanismo de resistência comum a diversos antimicrobianos (multidroga). Já foram descritos na literatura transportadores de antimicrobianos conferindo resistência a diversas classes de antimicrobianos como

tetraciclina, macrolídeos, fluorquinolonas e mais recentemente a aminoglicosídeos (Bambeke et al., 2003). Alguns autores relataram a existência de proteínas capazes de mediar a resistência a drogas em *Brucella* spp. por um mecanismo de efluxo dependente de energia (Braibant et al., 2002; Martin et al., 2009). Estes relatos embasam a hipótese do desenvolvimento de multirresistência em amostras de *B. abortus* pelo mecanismo de bomba de efluxo.

Marianelli e colaboradores (2004) descreveram um mecanismo de resistência à rifampicina em amostras de *Brucella* spp. associado de mutações no gene *rpoB*, gene codificador da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase dependente de DNA, local de ação da rifampicina. A existência de amostras de *B. abortus* resistentes e com susceptibilidade intermediária a rifampicina pode ser explicado pelo desenvolvimento deste mecanismo de resistência.

Estudos mais aprofundados devem ser realizados com o intuito esclarecer os possíveis mecanismos de resistência desenvolvidos pelas amostras de *B. abortus* resistentes e, principalmente, pelas duas amostras multirresistentes encontradas neste estudo.

A resistência encontrada em 6,0% das amostras testadas tem grande relevância clínica para o tratamento da brucelose humana, pois este dado indica que existem amostras de *B. abortus* no Brasil, isoladas de bovinos, que são resistentes aos antimicrobianos preconizados para o tratamento da doença. Assim, modificações na orientação quanto às drogas de escolha para o tratamento da brucelose humana, por *B. abortus*, no Brasil devem ser realizadas para se adequar as recomendações ao perfil de sensibilidade das amostras que circulam no país.

Foram encontradas, neste estudo, amostras resistentes a três dos quatro antimicrobianos considerados de primeira linha para o tratamento da brucelose humana, doxiciclina (DOX), rifampicina (RIF), estreptomocina (EST) e gentamicina

(GEN) (Joint..., 1986; Corbel et al., 2006; Ariza et al., 2007; Skalsky et al., 2008). Esta resistência pode ser explicada pelo uso destes antimicrobianos em muitos tipos de infecções nos bovinos. A gentamicina apresenta bons resultados no tratamento da mastite e está presente em muitas formulações comerciais no Brasil (Costa, 2006) e sua associação com a clindamicina vem sendo utilizada como padrão ouro no tratamento da endometrite puerperal, desde 1979 (Pinto, 2007). Estes dois tipos de infecções são muito comuns em bovinos, o que aumenta a utilização da gentamicina em bovinos no Brasil. A estreptomocina é uma base muito utilizada na formulação de medicamentos e é indicada para diversos tipos de infecções, como nas casos de leptospirose, diarreias, mastite, pneumonias, entre outros. A facilidade de acesso a esta droga, seu baixo custo e, principalmente, suas inúmeras indicações favorecem o uso indiscriminado da mesma.

A utilização destes antimicrobianos em larga escala na medicina veterinária pode ter levado ao desenvolvimento de resistência, tanto por uso incorreto (dose, tempo) dos medicamentos quanto por uso excessivo da base.

A utilização da rifampicina em casos de brucelose humana no Brasil é questionável, pois além da tendência de resistência a este antimicrobiano encontrada neste estudo (3 amostras resistentes e 54 amostras com perfil intermediário), soma-se a aprovação pelo Ministério da Agricultura, Pecuária, e Abastecimento (IN33) e início de comercialização de vacinas com a amostra RB51 no país desde 2009. Acidentes vacinais com a amostra RB51 não devem ser tratados com rifampicina, pois esta amostra é resistente a elevadas concentrações desta droga (Schurig et al., 1991; Ashford et al., 2004).

Uma das alternativas de tratamento para a brucelose humana envolve a combinação de doxiciclina com ofloxacina com ou sem a adição de outra base (Ariza et al., 2007). Como em nosso estudo 100% das amostras testadas foram susceptíveis a doxiciclina e a ofloxacina (Tabela 1), o tratamento opcional

sugerido por Ariza e colaboradores (2007) parece ser o mais indicado para o tratamento da brucelose humana por *B. abortus* em nosso país. Porém, a adição de outra base nesta combinação pode ser uma alternativa mais segura, já que Skalsky e colaboradores (2009) relataram que o uso de uma quinolona associada à doxiciclina ou rifampicina é menos eficaz do que a associação da doxiciclina com rifampicina ou estreptomicina.

A determinação do perfil de susceptibilidade dos isolados de *B. abortus* teve como finalidade o estabelecimento de padrões de sensibilidade das amostras de origem bovina existentes no Brasil, que podem ser associados à origem ou tipificação das amostras. As amostras resistentes encontradas neste estudo se distribuíram pelos Estados de Minas Gerais, Pará e Rio Grande do Sul (Tabela 3), sendo as duas amostras multirresistentes originadas do Estado de Minas Gerais. Entretanto, não houve interação entre o perfil de susceptibilidade das amostras com sua origem, biotipificação e genotipificação (Tabela 4). Foram observados quatro biovariedades diferentes dentre as amostras resistentes, o que indica uma grande variação entre essas amostras (Tabela 4), já que até o presente momento foram relatadas cinco biovariedades (1, 2, 3, 4 e 6) no Brasil (Minharro, 2009). Dentre as amostras resistentes encontradas no Estado de Minas Gerais, 75% (3/4) pertenciam à biovariedade 1 e no Estado do Pará 100% das amostras resistentes pertenciam à biovariedade 3; porém não podemos afirmar que estes dados mostram algum tipo de interação, pois foi demonstrado por Minharro (2009) que a biovariedade 1 é a mais frequente no Estado de Minas Gerais e a biovariedade 3 a mais frequentemente encontrada no Estado do Pará. Resultados semelhantes foram observados pela genotipificação pelo painel 1 do MLVA16, pois os genótipos encontrados entre as amostras resistentes foram aqueles mais frequentes no Brasil (Minharro, 2009). A ausência de interação entre a genotipificação e o perfil de susceptibilidade das amostras fica ainda mais clara quando analisamos os painéis 2A e 2B, que

apresentam maior diversidade (Le Flèche et al., 2006; Minharro, 2009), pois maior discrepância entre os resultados foi observada. Podemos concluir então que através das técnicas de bio- e genotipificação não foi possível o agrupamento e a identificação das amostras resistentes de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil.

## 5. CONCLUSÕES

A grande maioria das amostras testadas foi sensível aos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento da brucelose humana;

Todas as amostras de *B. abortus* testadas foram sensíveis à doxiciclina e ofloxacina;

Foram encontradas baixas frequências de amostras resistentes à ciprofloxacina, estreptomicina, gentamicina, sulfametoxazol + trimetoprim e rifampicina. Entretanto, para este último antimicrobiano foi observada uma alta frequência de amostras com susceptibilidade intermediária;

Duas (22,2%) dentre as nove amostras resistentes encontradas apresentaram multirresistência (perfis F e G);

Não foi verificada uma interação entre o perfil das amostras e sua origem, biotipificação e genotipificação pelo MLVA16.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, v. 3, 580 p., 2003.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; et al. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 188p.



- AL-DAHOUK, S., LE FLÈCHE, P.; NÖCKLER, K.; et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods*, v. 69, n.1, p. 137-45, 2007.
- ANTIMICROBIAL Resistance - WHO, janeiro de 2002. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- ARIZA, J.; BOSILKOVSKI, M.; CASCIO, A. et al. Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21 st Century: The Ioannina Recommendations., v. 4, n. 12, e317, 2007.
- ASHFORD, D. A.; DI PIETRA, J.; LINGAPPA, J. J. et al. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v.22, n. 25-26, p.3435-3439, 2004.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B.S.; et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, v. 95, n. 4, p. 271-275, 1992.
- BAMBEKE, F. V.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother*, v. 51, p. 1055–1065, 2003.
- BARBUDDHE, S. B.; KUMAR, P.; MALIKA, S. V. et al. Seropositivity for intracellular bacterial infection among abattoir associated personnels. *J Commun Dis*, v.32, n.4, p.295-299, 2000.
- BRAIBANT, M.; GUILLOTEAU, L.; ZYGMUNT, M. S. Functional Characterization of *Brucella melitensis* NorMI, an Efflux Pump Belonging to the Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family. *Antimicrob Agents Chemother*, p. 3050–3053, 2002.
- BERKELMAN, R. L. Human illness associated with use of veterinary vaccines. *Clin Infect Dis*, v.37, p.407-424, 2003.
- BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 6, p.1640-1642, 1995.
- CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infect Dis*, v.3, n.2, p.213-221, 1997.
- CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. (Ed.). Brucellosis in humans and animals. Geneva: WHO Press, 2006. 89p.
- COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 501-515, 2006.
- CUNHA, S. “Mecanismos de atuação dos antibióticos e mecanismos de resistências aos antibióticos”. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2003. (Palestra proferida no Curso de Antibióticos, Hospitais da Universidade de Coimbra)
- ENRIGHT, F.M. The pathogenesis and pathobiology on *Brucella* infection in domestic animals. In: NIELSEN, K.; DUCAN, J. R. Animals brucellosis. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- FROST, J. A. Testing for resistance to antimicrobial drugs. In: CHART, H. Methods in Practical Laboratory Bacteriology. Boca Raton: CRC, 1994. p. 73-82.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. A.; MUÑOZ BELLIDO, J. L.; FRESNADILLO, M. J.; et al. In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, n. 4, p. 911–913, 1993.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. A.; GARCÍA SÁNCHEZ, J. E.; TRUJILLANO, I.; et al. Susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to clinafloxacin and four other new fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, n.5, p. 1194-95, 1995.

GOULD, I. M. Clinical relevance of increasing glycopeptides MICs against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 31, n. 2, p. 1-9, 2008.

JOINT FAO/WHO expert committee on brucellosis. *World Health Organ Tech Rep Ser*, v. 740, p.1–132, 1986.

KOCAGÖZ, S.; AKOVA, M.; ALTUN, B.; et al. In vitro activities of new quinolones against *Brucella melitensis* isolated in a tertiary-care hospital in Turkey. *Clin Microbiol Infect*, v. 8, n. 4, p. 240 – 242, 2002.

LE FLÈCHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol*, v. 6, n. 9, p.1-14, 2006.

MAC FADDIN, J. F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires: Panamericana, 1980. 301 p.

MAHAJAN, N.K.; KULSHRESTHA, R.C.; VASUDEVAN, B. Brucellosis – cause of abortion in sheep and its public health significance. *Int J Zoonoses*, v.13, n.3, p.174-179, 1986.

MANUAL of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 5 ed. Paris: OIE - Office International des Epizooties, p. 328 - 345, 2008.

MANUAL técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/DAS, 2006. 184p.

MARIANELLI, C.; CIUCHINI, F.; TARANTINO, M.; et al. Genetic Bases of the Rifampin Resistance Phenotype in *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*, p. 5439–5443, 2004.

MARTIN, F. A.; POSADAS, D. M.; CARRICA, M. C.; et al. Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. *J Bacteriol*, p. 2530–2540, 2009.

METHODS for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006. (CLSI document M45-A)

MINHARRO, S. Isolamento, tipificação e genotipagem de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil. 2009. 85p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances Veterinary Science Comparative Medicine*, v.24, p.69-98, 1980.

OIE List of Antimicrobial of Veterinary Importance, 2007. Disponível em: [http://www.oie.int/downld/Antimicrobials/OIE\\_list\\_antimicrobials.pdf](http://www.oie.int/downld/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf)

PERFORMANCE Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2005. (CLSI document M100-S15)

PERFORMANCE Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008. (CLSI document M100-S18)

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. *Medicina Interna*, v. 10, n.2, p.91-100, 2003.

PINTO, E. A. T, Apostila de farmacologia medicina veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 02, supl., p. 29-39, 2007.

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

- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; et al. Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equínos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
- RAMOS, T. R. R.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; SOBRINHO, P. A. M. Epidemiological Aspects of an Infection by *Brucella abortus* in Risk Occupational Groups in the Microregion of Araguaína, Tocantins. *Braz J Infect Dis*, v. 12, n. 2, p. 133-138, 2008.
- SCHURIG, G. G.; ROOP, R. M. II; BAGCHI, T.; et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol.* v.28, p.171-188, 1991.
- SANTOS, H. P.; TEIXEIRA, W. C.; Michele Moreira Martins OLIVEIRA, M. M. M.; et al. Brucelose bovina e humana diagnosticada em matadouro Municipal de São Luís - MA, Brasil. *Cienc. Vet. Trop.*, v. 10, n. 2/3, p. 86 – 94, 2007.
- SANTOS-NETO, L. L.; COSTA, G. P.; SIMAAN, C. K. Abscesso esplênico por *Brucella abortus*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 32, n. 1, p. 53-55, 1999.
- SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M. et al. Brucelose Bovina. *Cad Tec Vet Zoot*, n.47, p.1-12, 2005.
- SILVESTRE, A. M., et al.; “Antibióticos na prática hospitalar”. *Permanyer Portugal Marketing, Publicidade e Edições*, p. 81-105, 1998.
- SOUZA, A. P.; MOREIRA FILHO, D. C.; FÁVERO, M. Investigação da brucelose em bovinos e em consumidores humanos do leite. *Rev Saúde Publ*, v. 11, p. 238-47, 1977.
- SKALSKY, K.; YAHAV, D.; BISHARA, J. et al. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, v. 336, n. 7646, p. 701-4, 2008.
- TENÓRIO, T. G. S.; MELO, L. E. H.; MOTA, R. A.; et al. Pesquisa de fatores de risco para a brucelose humana associados à presença de brucelose bovina no município de Correntes, Estado de Pernambuco, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.75, n.4, p.415-421, 2008.
- TRUJILLANO-MARTÍN, I.; GARCÍA-SÁNCHEZ, E.; MARTÍNEZ, I. M.; et al. In vitro activities of six new fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n.1, p. 194-195, 1999.
- VERGNAUD, G.; POURCEL, C. Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis (MLVA). In: *Molecular identification, systematic and population structure of prokaryotes*. STACKEBRANDT, E. Ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag, pp. 83–104, 2006.
- YAMAZHAN, T.; AYDEMIR, S.; TÜNGER, A.; et al. In vitro activities of various antimicrobials against *Brucella melitensis* strains in the Aegean region in Turkey. *Med Princ Pract*, v. 14, n. 6, p. 413-6, 2005.