

GABRIEL CARVALHO DE MACEDO

**EQUINOS E A ENZOOTIA DE *BRUCELLA* SPP. NA REGIÃO DO PANTANAL
SUL-MATO-GROSSENSE**



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA**

CAMPO GRANDE/MS
2016

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Equinos e a enzootia de *Brucella* spp. na região do Pantanal
Sul-Mato-Grossense

Autor: Gabriel Carvalho de Macedo
Orientador: Heitor Miraglia Herrera
Co-orientador: Carina Elisei de Oliveira

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva aplicada a Saúde, Ambiente e Sustentabilidade."

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco - UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

M141e Macedo, Gabriel Carvalho de

Equinos e a enzootia de *Brucella* spp na região do Pantanal Sul -
Mato-Grossense/ Gabriel Carvalho de Macedo; orientação Heitor
Miraglia Herrera. - 2016.
74 f. + anexos

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade
Agropecuária) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande,
2016.

Inclui bibliografias

1. Brucella - Pecuária no Pantanal - 2. Brucella - Equinos -
3. Brucella - Enzootia - 4. Brucella - Animais Silvestres.
I. Herrera, Heitor Miraglia. II. Título

CDD - 636.10896

Equinos e a enzootia de *Brucella* spp. na região do Pantanal Sul-mato-grossense

Autor: Gabriel Carvalho de Macedo
Orientador: Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera
Coorientadora: Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária
Área de concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva

APROVADO em 30 de janeiro de 2017.



Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera - UCDB
(Orientador)



Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB
(Coorientadora)



Profa. Dra. Grácia Maria Soares Rosinha - EMBRAPA



Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges - UFMS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Dinair Carvalho de Lima Conceição e José Carlos de Macedo, pelo total apoio e incentivo, e também pela compreensão;

À minha namorada, Juliana Akemi Matsubara Miyajima, que durante esses dois anos suportou toda a minha aflição e preocupação para com o mestrado, além de me incentivar e me apoiar;

Ao meu orientador Heitor Miraglia Herrera e à sua esposa Gisele Braziliano de Andrade, pela sua amizade e carinho, e que juntos, têm sido como pais para mim;

À minha co-orientadora, Carina Elisei de Oliveira, que me instruiu em todos os aspectos do meu trabalho, me acalmando nos momentos de aflição e preocupação, e me tratando com carinho e gentileza;

Aos meus amigos da pós-graduação, Wanessa Teixeira Gomes Barreto, Filipe Martins Santos, Grasiela Edith de Oliveira Porfírio, Leonardo Nascimento e João Bosco, que conviveram diariamente comigo, dividindo alegrias, preocupações e tristezas, e me ajudando em vários aspectos;

Às colaboradoras do Biosaúde, Maria Helena, Dayane Dias, Nathália Viana e Regilene, que auxiliaram em diversas partes do meu trabalho de mestrado. Sem elas, este trabalho não teria sido finalizado;

Às secretarias dos programas de Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária e de Biotecnologia, Daiane e Silvia, pela convivência e pela simpatia;

Aos funcionários da Fazenda Alegria, Dona Lurdes, Seu Valter, Marquinhos, José Caruana, Boca, e todos os outros que de alguma forma contribuíram neste trabalho, seja me auxiliando nas coletas, ou me atendendo de forma educada e gentil;

BIOGRAFIA

Gabriel Carvalho de Macedo nascido na cidade de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul no dia 04 de fevereiro de 1993, filho de José Carlos de Macedo e Dinair Carvalho de Lima Conceição. O autor deste trabalho é formado em Medicina Veterinária no ano de 2014, pela Universidade Católica Dom Bosco. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco, com área de concentração: Saúde, Ambiente e Sustentabilidade, na turma de Janeiro 2015.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
Objetivo Geral	3
Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Agente etiológico	4
3.2 Enzootia	5
3.3 Biologia e patogenia de <i>Brucella</i> spp.	6
3.4 Importância de <i>Brucella</i> spp. na saúde pública	7
3.5 Infecção por <i>Brucella</i> spp. em animais domésticos	9
3.6 Reservatórios silvestres para <i>Brucella</i> spp.	10
3.7 Infecção por <i>Brucella</i> spp. nos equídeos	12
3.8 Métodos de diagnóstico	15
3.9 Considerações finais	18
3.10 Referências	18
Capítulo 1: Detection of autochthonous <i>Brucella</i> spp. in horses from Pantanal wetland	30
ABSTRACT	30
INTRODUCTION	31
MATERIAL AND METHODS	32
RESULTS	34
DISCUSSION	35

CONCLUSION	37
REFERENCES	37
Capítulo 2: Maintenance of <i>Brucella</i> spp. in the Pantanal floodplain by a complex reservoir system	44
ABSTRACT	44
INTRODUCTION	45
OVERVIEW ON <i>BRUCELLA</i> SPP. IN BRAZILIAN PANTANAL	46
CONCLUSION	48
REFERENCES	49

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Tabela 1: Espécies e biovares de <i>Brucella</i> spp., morfologia e hospedeiros preferenciais.	5
2. Tabela 2: Testes sorológicos para <i>Brucella</i> spp. em equídeos.	14
3. (Capítulo 1 – Table 1) Occurrence of antibodies anti- <i>Brucella</i> and detection of DNA of <i>Brucella</i> spp. in sampled horses born and bred at Brazilian Pantanal, categorized by groups according to age and gender.	34
4. (Capítulo 1 – Table 2) Statistical differences between antibodies anti- <i>Brucella</i> occurrences in sampled horses born and bred at Brazilian Pantanal, categorized by groups according to age and sex.	34
5. (Capítulo 2 – Table 1) Serological diagnostic of <i>Brucella</i> spp. in different mammal species in Brazilian Pantanal, Mato Grosso do Sul.	46
6. (Capítulo 2 – Table 2) Different target genes used in molecular assays for <i>Brucella</i> spp. Detection from whole blood samples of different mammal species from Brazilian Pantanal, Mato Grosso do Sul.	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Figura 1: Incidência de brucelose humana no mundo.	8
2. Figura 2: Equino apresentando fistula na região da cernelha, lesão característica de infecção por <i>Brucella</i> spp.	13
3. Figura 3: Ciclo de transmissão de <i>Brucella</i> entre diferentes espécies de mamíferos.	15

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA = do inglês “Deoxyribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucleico;
EDTA = do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid” - Ácido etilenodiamino tetraacético;
PCR = do inglês “Polymerase chain reaction” - Reação da cadeia em polimerase;
2ME = 2-Mercaptoetanol;
AAT = Antígeno Acidificado Tamponado;
cELISA = Ensaio competitivo imunossorvente ligado a enzima;
FC = Fixação do complemento;
RB = Rosa Bengala;
RIV = Rivanol;
SAM = Soroaglutinação de microtítulo;
SAP = Soroaglutinação em placa;
SAT = Soroaglutinação em tubo;
FPA = do inglês “Fluorescence Polarization Assay” - Teste de polarização fluorescente;
SLA = do inglês “Smooth Layer Antigen” - Antígeno de parede lisa;
AGID = do inglês “Agar Gel Immunodiffusion” - Imunodifusão em gel de agarose;
OMP = do inglês “Outer membrane protein” - Proteínas de membrana externa;
Ig = Imunoglobulina;
LPS = Lipopolissacarídeo;
CEUA = Comitê de ética para uso de animais;
UCDB = Universidade Católica Dom Bosco;
BCSP = do inglês “*Brucella* Cell Surface Protein”;
TSB = do inglês “Tryptic soy broth”;
TSA = do inglês “Tryptic soy agar”;
Chr = Cromossomo;
Mb = Mega pares de bases;
pb = Pares de bases;

RESUMO

Brucella spp. é uma bactéria intracelular facultativa que possui a capacidade de infectar diferentes espécies de animais domésticos e selvagens e possui grande importância na economia rural e na saúde pública, por provocar abortos em animais de criação e uma doença debilitante em seres humanos. Diferentemente de outros hospedeiros ungulados, equinos infectados não apresentam doença reprodutiva, não apresentando um papel importante na cadeia epidemiológica. Objetivou-se neste estudo avaliar se equinos encontram-se infectados por *Brucella* spp. no Pantanal sul-mato-grossense, uma região endêmica para a brucelose bovina. Ainda, objetivou-se discutir a enzootia da *Brucella* spp. no Pantanal com enfoque no papel de diferentes espécies de mamíferos hospedeiros. Foram coletadas, inicialmente, amostras de sangue total e soro de 179 equinos, jovens e adultos, de ambos os sexos, e, a partir dos animais positivos aos testes sorológico e molecular, foram coletadas amostras de líquido sinovial e punção esplênica de. Os soros foram testados pelo teste Rosa Bengala e a ocorrência de anticorpos anti-*Brucella* foi de 26,3% (40/152). A partir do teste molecular (*bcsp31*), foi possível detectar DNA de *Brucella* spp. no sangue total de 1,7% (3/179) dos animais amostrados. Não houve positividade no teste molecular a partir de amostras de líquido sinovial e punção esplênica, bem como no isolamento bacteriano. A sorologia indicou que os machos jovens se encontram mais expostos a *Brucella* spp. do que as outras categorias. Seis espécies de animais silvestres e duas espécies de animais domésticos são reportadas na literatura infectadas por *Brucella* spp. no Pantanal, uma delas assumindo grande importância na enzootia de *Brucella* spp. na região devido as suas grandes populações, ao compartilhamento de habitats com bovinos e aos hábitos alimentares associados a necrofagia. Os cavalos não apresentam importância epidemiológica na transmissão de *Brucella* spp., mas podem atuar como sentinelas da infecção na região de estudo.

Palavras-chave: (1) *Brucella* spp.; (2) Equinos; (3) Pantanal; (4) Diagnóstico; (5) Enzootia; (6) Animais silvestres.

ABSTRACT

Brucella spp. is a facultative intracellular bacteria that has the ability to infect different species of domestic and wild animals and have great importance to the rural economy and public health, because it cause abortions in livestock and a debilitating disease in humans. Differently from other ungulate hosts, infected equines do not present reproductive disease, not having an important role in the epidemiological chain. The aim of the present study was to evaluate if horses are infected by *Brucella* spp. in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, an endemic region for bovine brucellosis. Also, it was aimed to discuss the enzooty of *Brucella* spp. in Pantanal with focus on the role of different species of mammalian hosts. Initially, samples of whole blood and serum were collected from 179 young and adult horses of both gender, and, from positive animals at serological and molecular tests, it was collected samples of synovial fluid and splenic puncture. Sera was tested by the Rose Bengal test and the occurrence of anti-*Brucella* antibodies was 26.3% (40/152). The molecular test (*bcs31*) detected *Brucella*-DNA in the whole blood of 1.7% (3/179) of sampled animals. There was no positivity in the molecular test from synovial fluid and splenic puncture samples, as well as bacterial isolation. Serology indicated that young males are more exposed to *Brucella* spp. than the other categories. Six species of wild animals and two species of domestic animals are reported in the literature infected by *Brucella* spp. in Pantanal. The feral pig assume great importance in the enzooty of *Brucella* spp. in the region due to its large populations, the sharing of habitats with cattle and feed habits associated to necrophagy. Horses do not present epidemiological importance in the transmission of *Brucella* spp., but they can act as sentinels of the infection in the studied region.

Key-words: (1) *Brucella* spp.; (2) Enzootic dynamics; (3) Equines; (4) Pantanal; (5) Rose Bengal; (6) Molecular tests;

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa mundialmente conhecida pelos prejuízos econômicos provenientes da debilitação dos animais enfermos e danos reprodutivos em bovinos infectados, diminuindo a produtividade e impedindo a exportação de produtos cárneos e lácteos. Ainda, por se tratar de uma zoonose transmitida por alimentos de origem animal contaminados, a brucelose tem grande importância na saúde pública (QUINN et al., 1994). Mesmo com a formulação de um programa de controle e erradicação da brucelose no início do século XXI, a doença ainda é endêmica em território brasileiro (BRASIL, 2006). Um dos obstáculos no controle dessa importante zoonose diz respeito à biologia de seu agente etiológico: um microrganismo intracelular facultativo multi-hospedeiro, capaz de infectar dezenas de espécies de mamíferos domésticos e silvestres (NICOLETTI, 1989). Neste cenário, por coabitar com outros animais de produção, o equino se torna um hospedeiro acidental nos ciclos de transmissão das espécies de *Brucella*, apresentando uma doença subclínica e crônica (LOPES et al., 1999; THOMASSIAN, 2005).

A grande preocupação com a brucelose bovina no Brasil desvia a atenção à presença da infecção em outras espécies de hospedeiros, principalmente naquelas que não são preferenciais à *Brucella* spp., como o equino. O esclarecimento da epidemiologia da infecção por *Brucella* spp. nos equinos, bem como o conhecimento das espécies que circulam nos equinos do Pantanal sul-mato-grossense podem subsidiar ações de controle e prevenção da infecção. Além disso, a maioria dos estudos acerca da brucelose equina é descrita sob a forma de relatos de caso ou levantamentos soro-epidemiológicos. Ainda, os mecanismos de transmissão, a perpetuação do agente nas populações hospedeiras e a predominância dos diferentes biotipos circulantes em determinada área ou região carecem de estudos detalhados.

Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho de equídeos da América Latina (oito milhões de cabeças, somando-se cavalos, muares e asininos), sendo o terceiro maior do mundo (MAPA, 2015). No Pantanal a população equina é de aproximadamente 49 mil animais (SEIDL et al., 1998), compartilhando o mesmo ambiente com diferentes

espécies de animais domésticos e selvagens. Nesse sentido, mesmo que o equino seja considerado resistente à infecção e não assuma importância na transmissão (ACOSTA-GONZÁLEZ et al., 2006), seu papel como espécie mantenedora do agente no contexto da enzootia no ambiente natural tem sido negligenciado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel de equinos na enzootia da *Brucella* spp. no Pantanal sul-mato-grossense.

2.2 Objetivos Específicos

Detectar anticorpos e DNA de *Brucella* spp. em equinos do Pantanal sul-mato-grossense;

Comparar as ocorrências de *Brucella* spp. em diferentes grupos de equinos de acordo com o sexo e faixa etária;

Isolar *Brucella* spp. de equinos amostrados no Pantanal sul-mato-grossense;

Avaliar o papel de diferentes espécies de hospedeiros reportados na literatura, incluindo o equino, na enzootia da *Brucella* spp. no Pantanal sul-mato-grossense.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agente etiológico

A brucelose é causada por bactérias do gênero *Brucella* que fenotipicamente são classificadas como cocobacilo curto, gram-negativo, aeróbico imóvel e não formador de esporos, medindo de 0,5 a 0,7 μm de diâmetro e de 0,6 a 1,5 μm de comprimento (CORBEL e BRINLEY-MORGAN, 1984). Morfologicamente, as colônias podem se apresentar de forma lisa ou rugosa, e isto está relacionado à composição da parede celular e à virulência de cada espécie. Segundo Nielsen (2002) esta diferença se dá pelo fato de que em espécies formadoras de colônias lisas, em sua cadeia de lipopolissacarídeos, há a presença da cadeia “O”, ao passo que as espécies formadoras de colônia rugosa não a possuem.

A classificação taxonômica do gênero *Brucella* compreende, com o isolamento de *Brucella papionis* a partir de babuínos em 2014, 11 diferentes espécies (Tabela 1). Deve-se ressaltar que embora as espécies de *Brucella* spp. possuam uma forte preferência por determinados hospedeiros, quase todas as espécies deste gênero podem infectar outras espécies de hospedeiros além daqueles pelos quais possuem preferência (GLYNN e LYNN, 2008).

Filogeneticamente e taxonomicamente o gênero *Brucella* está inserido na classe Alphaproteobacteria, a qual comporta também bactérias dos gêneros *Rhizobium* spp., *Rhodobacterium* spp., *Rickettsia* spp. e *Agrobacterium* spp. (MORENO et al., 1990). Análises moleculares demonstram que o genoma da maioria das espécies do gênero possui dois cromossomos circulares codificando aproximadamente 3,2 Mb (OLSEN e PALMER, 2014). No caso de *Brucella abortus*, por exemplo, os dois cromossomos (Chr) possuem 2.124.242 pares de bases (pb) e 1.162.780 pb (Chr I e Chr II respectivamente), apresentando uma alta similaridade com o genoma de *Brucella melitensis* e *Brucella suis* (HALLING et al., 2005). De fato, sequências genômicas de seis diferentes espécies de *Brucella* (*B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. canis*) apresentam uma homologia de mais de 94% em sua composição

nucleotídica, o que fez com que alguns autores reclassificassem gênero *Brucella* para uma única espécie e biovars de acordo com os hospedeiros (VERGER et al., 1985; VIZCAÍNO et al., 2000; CHAIN et al., 2005). Entretanto alguns fatores epidemiológicos, e características fenotípicas e fatores de virulência devem ser considerados em relação a classificação das espécies de *Brucella* spp. (OLSEN e PALMER, 2014).

Tabela 1. Espécies e biovars de *Brucella* spp., morfologia e hospedeiros preferenciais.

Espécie	Biovars	Morfologia da colônia	Hospedeiros preferenciais
<i>B. melitensis</i>	1-3	Lisa	Ovinos e caprinos
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Lisa	Bovinos
<i>B. suis</i>	1,3	Lisa	Suínos
	2	Lisa	Lebres, javalis selvagens
	4	Lisa	Renas e caribus
	5	Lisa	Roedores
<i>B. neotomae</i>	-	Lisa	Ratos do deserto
<i>B. ovis</i>	-	Rugosa	Carneiros
<i>B. canis</i>	-	Rugosa	Cães
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Lisa	Focas
<i>B. ceti</i>	-	Lisa	Cetáceos
<i>B. microti</i>	-	Lisa	Solo, ratazanas e raposas
<i>B. inopinata</i>	-	Lisa	Humanos
<i>B. papionis</i>	-	Lisa	Primatas

3.2 Enzootia

Diversas formas de transmissão de *Brucella* spp. em animais e em humanos são relatadas, e há uma variação na importância e ocorrência de acordo com as espécies de hospedeiros. Por exemplo, em biungulados a principal fonte de infecção são as fêmeas gestantes infectadas, que ao abortar ou parir, eliminam grandes quantidades de *Brucella abortus* no ambiente, contaminando pastagens, água e solo, e, dessa forma, contaminando outros animais pela via digestiva (BRASIL, 2006). A transmissão pelo coito, embora muito investigada, é incomum. Quando há a monta natural, o sêmen é depositado na vagina, onde existem mecanismos de defesa que dificultam o

estabelecimento da infecção. Ao contrário, na inseminação artificial o sêmen é depositado diretamente no útero, o que facilita o processo de infecção (LAGE et al., 2008).

Com relação às espécies rugosas de *Brucella* spp., a transmissão venérea entre ovinos e entre cães parece apresentar maior importância. Embora ovelhas se apresentem resistentes à infecção em alguns casos, elas podem carrear o patógeno na vagina por pelo menos dois meses, atuando como fonte de infecção. Os carneiros geralmente apresentam infecções crônicas persistentes, e a maioria destes animais eliminam *B. ovis* no sêmen por pelo menos dois anos. Em cães, foi reportado que o sêmen constitui uma importante fonte de eliminação devido ao alto número de bactérias presentes, principalmente entre três e 11 semanas pós-infecção, sendo que após este período a eliminação do patógeno via sêmen se torna intermitente. Isso ocorre porque em cães infectados cronicamente, *B. canis* permanece durante vários meses na próstata e epidídimo após a bacteremia (CARMICHAEL e GREEN, 1990; CARMICHAEL e SHIN, 1996; IICAB, 2007).

A transmissão para os seres humanos ocorre principalmente pela via digestiva, a partir do consumo de leite e seus derivados não pasteurizados, nos quais as espécies de *Brucella* spp. podem permanecer viáveis por duas semanas a três meses (CARVALHO et al., 1995). O contato direto das mucosas oral, respiratória ou conjuntiva e da pele escarificada com o ambiente contaminado ou com as secreções de animais infectados permite a entrada da bactéria no corpo humano. Neste sentido, a brucelose tem grande importância como uma doença ocupacional para médicos veterinários, tratadores e trabalhadores de centros de abate (YOUNG e SUVANNOPARRAT, 1975).

3.3 Biologia e Patogenia de *Brucella* spp.

As espécies de *Brucella* spp. apresentam características peculiares de resistência ao hospedeiro, induzindo infecções crônicas e persistentes, sobrevivendo e se multiplicando dentro de células fagocíticas (OLIVEIRA et al., 2002; SEXTON e VOGEL, 2002). Uma das mais importantes características biológicas da bactéria é sua capacidade de se evadir da resposta celular e humoral do hospedeiro (GORVEL e MORENO, 2002). O fato de ser uma bactéria intracelular facultativa contribui para a

dificuldade tanto no diagnóstico quanto na conduta terapêutica (GLYNN e LYNN, 2008).

Exceto pela produção de lipopolissacarídeos contendo a cadeia poli N-formil perosamine-O, estas bactérias não apresentam fatores de virulência, como cápsulas, fímbrias, flagelos, exotoxinas, exoproteases ou outras exoenzimas, citolisinas, variação antigênica, plasmídeos ou fagos lisogênicos (CORBEL, 1997; DELVECCHIO et al., 2002; MORENO et al., 2002). A sobrevivência no interior das células fagocitárias ocorre devido ao bloqueio da fusão fagossoma-lisossoma, de modo que elas sejam encontradas em um compartimento semelhante a um auto-fagossoma, multiplicando-se e se mantendo viáveis e protegidas da resposta imune humoral (JAHANS et al., 1997; GOLDING et al., 2001; OLIVEIRA e SPLITTER, 1996).

Após a infecção do hospedeiro, quer seja pela mucosa oral, nasofaríngea, conjuntival ou genital, ou até mesmo pelo contato direto com a pele, as bactérias replicam-se preferencialmente em fagócitos do sistema reticulo-endotelial, sendo transportadas para os linfonodos regionais e posteriormente para outros órgãos como baço e fígado. Em fêmeas prenhes, a bactéria invade células presentes na placenta e nas glândulas mamárias, e ali se replica extensivamente, causando um dos principais sintomas, o aborto (ROUX, 1989; MORENO, 2014).

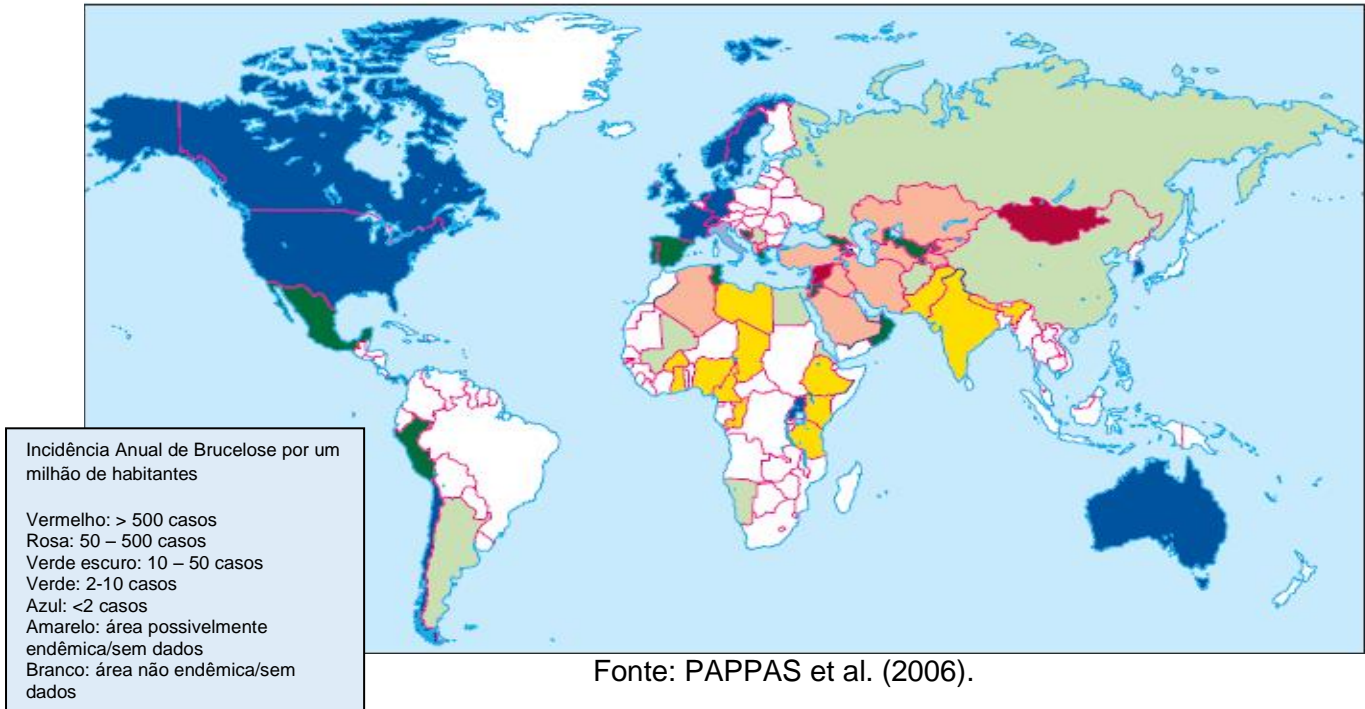
A bactéria tem predileção por tecidos que apresentam maior disponibilidade de elementos que estimulam a sua multiplicação. No caso dos animais biungulados destacam-se os produtos da degradação do eritritol, um poli álcool formado por quatro carbonos que está presente nos tecidos osteoarticulares, mamários e órgãos reprodutores femininos e masculinos, atingindo altas concentrações no útero gravídico e placenta (KEPPIE et al., 1965; MEYER, 1967; SPERRY e ROBERTSON, 1975; QUINN et al., 1994;).

3.4 Importância de *Brucella* spp. na saúde pública

A epidemiologia da brucelose humana mudou drasticamente nas últimas décadas, em função de mudanças socioeconômicas, políticas e sanitárias, e também da globalização. Países que antes eram considerados endêmicos conseguiram controlar a doença (França e Israel, por exemplo), havendo também a emergência de novos focos (na Ásia, por exemplo), e, embora constitua uma das zoonoses mais

importantes, a brucelose humana é, em algumas regiões, uma doença negligenciada (PAPPAS et al., 2006) (Figura 1).

Figura 1. Incidência de brucelose humana no mundo.



Atualmente, aproximadamente meio milhão de casos são reportados anualmente no mundo, e embora este número seja alto, o número de casos não reportados, por diversos motivos (sintomas inespecíficos da doença, falhas nos métodos de diagnóstico ou subnotificações), pode ser ainda maior (CARVALHO et al., 1995; GODFROID et al., 2013a). Atualmente, a brucelose humana é reconhecidamente endêmica na região do Mediterrâneo, oeste asiático, África e América do Sul, além de ser considerada uma doença ocupacional em indivíduos que trabalham diretamente em contato com animais (PAPPAS et al., 2006; BISLIMOVSKA et al., 2010).

Diferentes espécies como *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis* e espécies que infectam mamíferos marinhos são consideradas zoonoses (PAPPAS, 2010). Em áreas endêmicas para *B. abortus* no gado, a soroprevalência em humanos ocorre entre 1 e 5%, ao passo que em áreas endêmicas para *B. melitensis* a soroprevalência é maior (PAPPAS et al., 2006; SWAI e

SCHOONMAN, 2009). Devido a grande maioria de casos subclínicos, a infecção por *B. canis* tem sido sub-diagnosticada no homem (LUCERO et al., 2010; NOMURA et al., 2010). As infecções por espécies marinhas de *Brucella* são raramente reportadas (BREW et al., 1999; SOHN et al., 2003; MCDONALD et al., 2006;), e ainda não se sabe qual a importância clínica de *B. inopinata* nos seres humanos (SCHOLZ et al., 2010).

No Brasil, os dados sobre a situação epidemiológica da brucelose humana são escassos. Com exceção de alguns relatos pontuais (GONÇALVES et al., 2006; RAMOS et al., 2008; ANGEL et al., 2012; MEIRELLES-BARTOLI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013), não existem estudos recentes que contextualizem a situação no país, reflexo da sub-notificação de casos humanos em território nacional.

3.5 Infecção por *Brucella* spp. em animais domésticos

Dentre as espécies de *Brucella* spp. que infectam os animais domésticos, considera-se que *B. abortus* é a de maior importância, principalmente devido ao fator econômico: é reportada em quase todas as regiões onde existe a criação de gado, com exceção de alguns países da Europa, a Austrália, o Canadá, o Japão e a Nova Zelândia. Bovinos são considerados os hospedeiros preferenciais, mas bubalinos, camelídeos, cervídeos e pequenos ruminantes também são susceptíveis, apresentando os mesmos sinais clínicos que bovinos (aborto, infertilidade, doença reprodutiva), e, tendo um importante papel na transmissão e persistência do patógeno no ambiente (DÍAZ APARÍCIO, 2013).

A ocorrência da brucelose bovina, causada por *B. abortus*, no território brasileiro, pode variar enormemente, de 0,3% a 41,5% (POESTER et al., 2002; CHATE et al., 2009; SIKUSAWA et al., 2009). De acordo com publicações oficiais, a prevalência da brucelose no Brasil permaneceu entre 4% e 5% no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006). A região sudeste apresenta a maior prevalência (7,5%), seguido das regiões centro-oeste (6,8%), norte (4,1%), sul (4,0%) e nordeste (2,5%) (BRASIL, 1977).

Em relação a *B. suis*, são reconhecidos cinco biovars, sendo os biovars 1, 2 e 3 responsáveis por causar infertilidade, aborto, doenças reprodutivas e articulares em suínos. Os biovars 1 e 3 são distribuídos mundialmente, principalmente em áreas onde existem criações de suínos, respeitando uma certa distribuição: o biovar 1 é mais frequente nos continentes americanos e na Ásia, enquanto que o biovar 3 tem sido

reportado com maior frequência na China, Estados Unidos e continente europeu, e ambos apresentam prevalências baixas, exceto na América do Sul e sudeste da Ásia (OIE, 2010). Ainda, suínos podem se infectar por *B. abortus* e *B. melitensis*, principalmente em regiões endêmicas para essas espécies em ruminantes (EFSA, 2009).

A espécie considerada mais virulenta do gênero é a *Brucella melitensis*, sendo os biovars 1 e 3 os mais frequentemente isolados em pequenos ruminantes na América Latina, Oriente Médio e região do Mediterrâneo (no Brasil não existem relatos). Caprinos e ovinos são considerados os hospedeiros naturais, preferenciais. Em termos epidemiológicos e patológicos, a infecção por *B. melitensis* em pequenos ruminantes se equipara à infecção por *B. abortus* no gado, e a principal manifestação clínica é o aborto e o nascimento de natimortos, normalmente no terço final da gestação (BLASCO e MOLINA-FLORES, 2011).

Membros da família Canidae são os hospedeiros reservatórios preferenciais de *B. canis*. Historicamente, os primeiros relatos de infecção em cães na década de 70 foram associados à raça Beagle, provavelmente por conta da popularidade e do uso desta raça como cobaias (POLLOCK, 1979). Hoje em dia já se sabe que independentemente da raça, qualquer cão reprodutivamente ativo é susceptível à infecção, e surtos já foram documentados em diversas regiões no mundo (YAMAUCHI et al., 1974; FLORES-CASTRO et al., 1977; TAYLOR, 1980; SEBEK et al., 1983; JIAN, 1992; MAIA et al., 1999). Embora amplamente distribuída, considera-se que a brucelose canina por *B. canis* possua importância apenas em locais destinados à produção e reprodução de animais puros (canis) (HOLLETT, 2006), diferentemente da brucelose canina causada por *B. abortus*, a qual mostrou ser de maior importância epidemiológica em ambientes rurais (BAEK et al., 2003; OLIVEIRA, 2015).

3.6 Reservatórios silvestres para *Brucella* spp.

Diversas espécies de mamíferos selvagens podem constituir fonte de infecção para *Brucella* spp., principalmente para animais de produção que vivem em simpatria. Isso ocorre porque entre o gado e alguns animais silvestres, principalmente ungulados selvagens como cervídeos e suídeos, pode ocorrer compartilhamento de habitats, água e alimentos. É o caso, por exemplo, do processo histórico de transmissão de *Brucella* spp. entre o gado e os cervos que habitam o Parque Yellowstone nos Estados

Unidos (KAMATH et al., 2016). Em situações como esta, é difícil distinguir se houve a disseminação do agente a partir do gado, ou se sempre existiu uma enzootia natural mantida por mamíferos silvestres (GODFROID et al., 2013b). O fato é que a modificação ambiental de origem antropogênica resulata, a médio e longo prazo, modificações genéticas dos hospedeiros silvestres, provocando mudanças na susceptibilidade dos mesmos aos agentes infecciosos, modificando as formas de transmissão (MORENO, 2014).

Diferentes espécies de *Brucella* spp. já foram isoladas de uma grande variedade de mamíferos silvestres, incluindo o bisão (*Bison bison*), o boi-almiscarado (*Ovibos moschatus*), o cervo (*Cervus elaphus canadenses*), o alce (*Alces alces*), a rena (*Rangifer tarandus tarandus*), o caribu (*Rangifer tarandus groenlandicus*), o cariacu (*Odocoileus virginianus*), a corça (*Capreolus capreolus*), o “chamois” (*Rupicapra rupicapra*), o búfalo-africano (*Syncerus caffer*), a impala (*Aepyceros melampus*), a piva (*Kobus elipsiprymnus*), a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), o graxaim-do-campo (*Dusicyon gymnocercus*), a raposa-cinzenta-argentina (*Dusicyon griséus*), o guaxinim (*Procyon lotor*), o gambá (*Didelphis virginiana*), a lebre-europeia (*Lepus europaeus*), o porco feral (*Sus scrofa*) e a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (DAVIS, 1990; GODFROID, 2004).

A variedade de hospedeiros de *Brucella* spp. não se restringe apenas a mamíferos terrestres. Desde a primeira descrição de um caso de aborto devido a *Brucella* spp. em um golfinho cativo na Califórnia, diversos estudos descreveram e caracterizaram novas espécies do gênero a partir de uma grande variedade de mamíferos marinhos. Existem relatos de isolamento de *Brucella* spp. a partir de leões marinhos, focas, golfinhos e baleias (FOSTER et al., 1996; MUNOZ et al., 2006; TRYLAND et al., 1999), e embora haja uma certa variedade de espécies de hospedeiros marinhos, as duas únicas espécies isoladas são *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*.

Assim como acontece na vida silvestre terrestre, ações humanas como a caça, a contaminação de mares e a constante exploração de fontes naturais de recursos alteram os ciclos de transmissão e taxas de infecção *Brucella* spp. em mamíferos marinhos. Essas atividades promovem o agrupamento de diferentes mamíferos marinhos infectados em áreas onde os recursos ainda são disponíveis, causando estresse, subnutrição, imunossupressão e, conseqüentemente, favorecendo a seleção de organismos do gênero *Brucella*, com altas taxas de transmissão (OHISHI

et al., 2008; MAQUART et al., 2009; VAN BRESSEM et al., 2009; GUZMÁN-VERRI et al., 2012).

3.7 Infecção por *Brucella* spp. nos equídeos

A brucelose em equídeos se caracteriza como uma doença crônica, infectocontagiosa e zoonótica (ACHA e SZYFRES, 2003). Diferentemente do que ocorre em outras espécies infectadas por *Brucella* spp., os transtornos reprodutivos são raros no equino, e, por isto, os prejuízos econômicos não são considerados, em comparação a outras espécies de interesse zootécnico (RIBEIRO et al., 2003). Nesta espécie, o prejuízo provém de lesões debilitantes, do sacrifício dos animais acometidos e do fato de que podem atuar como fontes de infecção para outros animais (RADOSTITS et al., 2000).

Apesar do pouco conhecimento sobre a fonte de infecção e o modo de transmissão da brucelose equina, considera-se que a infecção seja resultado da coabitação de equinos com outras espécies como os bovinos e suínos, visto que os equinos compartilham da infecção apenas por *B. abortus* e *B. suis*. Equinos estariam se infectando através da ingestão de água e alimentos contaminados pelo microrganismo proveniente de descargas vaginais, produtos de abortos e restos placentários de vacas e porcas infectadas (LANGENEGGER e SZECHY, 1961; COOK e KINGSTON, 1988; ACHA e SZYFRES, 2003; CASTRO et al., 2005;).

Equinos possuem ausência ou baixa produção de eritról, o que justifica o reduzido impacto da brucelose como doença reprodutiva e rotula esta espécie como “hospedeiro acidental” (RIBEIRO et al., 2008). As lesões mais sugestivas em equinos são representadas por inflamações de caráter purulento em bolsas sinoviais, ligamentos, tendões e articulações, preferencialmente no local de junção das duas escápulas (cernelha) (Figura 2) (VASCONCELLOS et al., 1987; PAULIN, 2003;). À palpação, a área lesionada mostra-se distendida, endurecida, hiperêmica e com pontos de flutuação, que tendem à abscedação de um líquido seropurulento amarelado, o qual contém bactérias viáveis (PAULIN, 2003; CASTRO et al., 2005; THOMASSIAN, 2005). Raramente são observados quadros de infecção generalizada nos animais, os quais se manifestam por febre intermitente, rigidez, letargia, inapetência e dificuldade de locomoção, geralmente secundário ao desenvolvimento de bursite cervical (RIET-CORRÊA et al., 2003).

Diversos estudos utilizando diferentes métodos de diagnóstico sorológico demonstram que *Brucella* spp. está mundialmente distribuída em populações de equídeos (Tabela 2).

Figura 2. Equino apresentando fístula na região da cernelha, lesão característica de infecção por *Brucella* spp.



Fonte: Arquivo pessoal

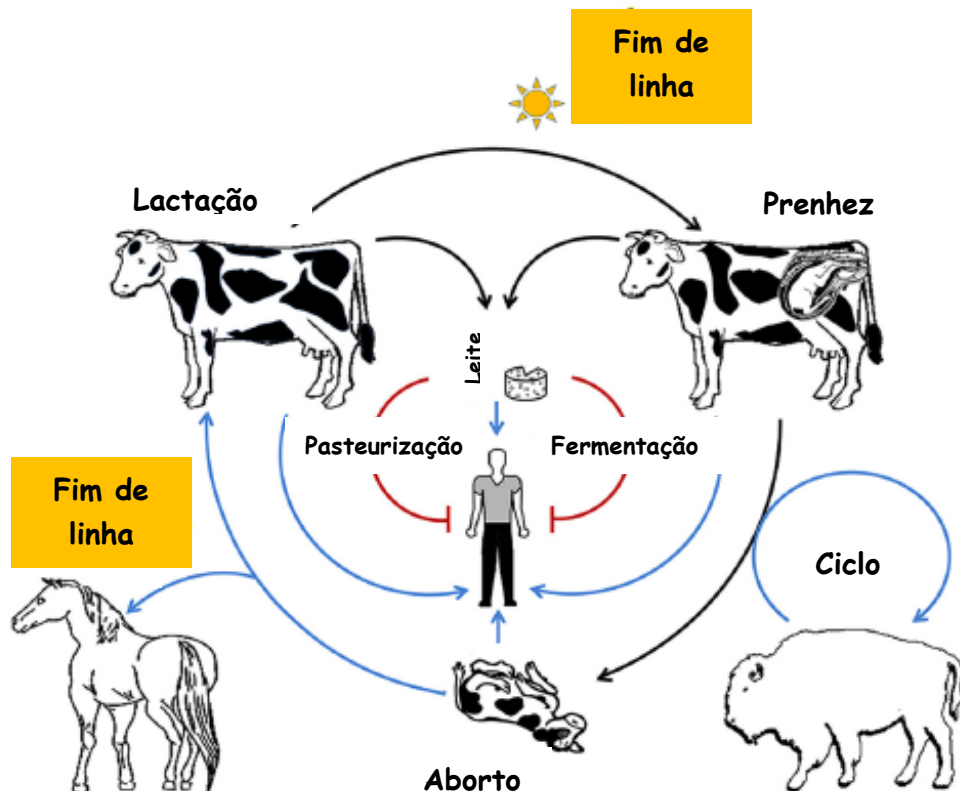
Tabela 2. Diferentes testes de diagnóstico sorológico de *Brucella* spp. em equídeos de diferentes regiões do mundo.

Brasil e América	Teste sorológico	Soroprevalências	Referências
Brasil (Pará)	RB	5,8%	Pinho et al., 2014
Brasil (Rondônia)	RB; SAT; 2ME	3,4%	Aguiar et al., 2008
Brasil (Rio Grande do Norte)	RB; SAT; 2ME	1,8%	Dorneles et al., 2013
Brasil (Paraíba)	RB; 2ME; FC	3,7%; 0,7%; 0,6%	Arruda et al., 2012
Brasil (Minas Gerais)	RB; 2ME; SAT	8,18%; 0%; 2,9%	Araújo et al., 2009
Brasil (Minas Gerais)	RB; SAT	1,4%	Junqueira Jr et al., 2015
Brasil (Minas Gerais)	RB; 2ME	40%; 4,67%	Furquim et al., 2012
Brasil (São Paulo)	SAP; SAT; 2ME; EDTA	18,4%; 18,1%; 0,7%; 10%	Bueno et al., 2002
Brasil (São Paulo)	SAP; SAT; 2ME; RB	Estudo de caso	Ribeiro et al., 2003
Brasil (Paraná)	RB; SAT; 2ME	6,5%; 0,8%	Antunes et al., 2013
México	RB; RIV	0,4%; 0,2%	Acosta-González et al., 2006
Europa	Teste sorológico	Soroprevalências	Referências
Inglaterra	FC; RB	5,7%; 4,3%	Rankin, 1973
Croácia	RB; FC; cELISA	0,03%	Cvetnic et al., 2005
Turquia	RB; SAT	9,1%; 0,35%	Tel et al., 2011
Turquia (Hakkari)	SAT	9,5%	Göz et al., 2007
Sudão (Darfur)	RB; SAT; FC	4,8%	Musa, 2004
Nigéria	RB; SAT	Estudo de caso	Ocholi et al., 2004
Nigéria (Taraba)	RB; SAT	16%; 6%	Ardo e Abubakar, 2016
Nigéria (Borno e Yobe)	RB; SAM	5,5%	Sadiq et al., 2013a
Nigéria (Borno e Yobe)	RB; SAM; cELISA	5%; 5%; 3%	Sadiq et al., 2013b
Nigéria (Kaduna e Plateau)	RB	14,70%	Ehizibolo et al., 2011
África	Teste sorológico	Soroprevalências	Referências
Jordânia	RB; FC	0,27%; 0,22%	Abo-Shebada, 2009
Irã (Masshad)	RB; SAT	2,5%	Tahamtan et al., 2010
Irã (Shiraz)	RB; 2ME	0 - 10%	Tahamtan et al., 2008
Paquistão (Faisalabad)	RB; SAT	20,7%; 17,7%	Wadood, et al., 2009
Índia	SAT	3,5%	Sen et al., 1974
Oceania	Teste sorológico	Soroprevalências	Referências
Austrália	SAT; FC; RB	Estudo de caso	Carrigan e Cockram, 1987
Austrália (Queensland)	RB; FC	3,4%	Cook e Kingston, 1988

Legenda: **2ME**: 2-Mercaptoetanol; **EDTA**: Soroaglutinação em tubo com EDTA; **cELISA**: Ensaio competitivo imunossorvente ligado a enzima; **FC**: Fixação do complemento; **RB**: Rosa Bengala; **RIV**: Rivanol; **SAM**: Soroaglutinação de microtítulo; **SAP**: Soroaglutinação em placa; **SAT**: Soroaglutinação em tubo;

Existem divergências entre autores quanto à capacidade ou incapacidade de transmissão de *Brucella* spp. a partir de um equino. De acordo com Acosta-Gonzalez et al. (2006) e Moreno (2014) não existem evidências que sugerem que os equinos sejam uma importante fonte de infecção para outros animais, de modo que estes animais são considerados hospedeiros terminais ou “dead end” (Figura 3). Em contrapartida alguns autores afirmam que, em animais sintomáticos, o conteúdo do exsudato presente nas lesões é altamente rico em bactérias viáveis, e isso deve ser encarado como um fator de contaminação ambiental para outras espécies domésticas que coabitam com o equino, até mesmo para o homem (DENNY, 1973; RADOSTITS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2003).

Figura 3. Ciclo de transmissão de *Brucella* spp. entre diferentes espécies de mamíferos.



Fonte: MORENO, 2014

3.8 Métodos de diagnóstico

Animais infectados por *Brucella* spp. podem ser identificados utilizando-se de meios diretos e/ou indiretos (NIELSEN et al., 1998). O exame bacteriológico pode ser

realizado a partir de material proveniente do leite, de swabs vaginais, de fetos abortados, linfonodos mamários, retrofaríngeos e ilíacos, abscessos presentes em órgãos reprodutivos, baço, fígado e, eventualmente, a partir de amostras de sangue. As bactérias podem ser isoladas em meios convencionais como o ágar-sangue ovino (5%) desfibrinado, em condições de microaerofilia, a 37° C, entre três a cinco dias. O meio *Farrel* é recomendado para materiais com suspeita de contaminação por outros microrganismos porque contém vários agentes antimicrobianos. As colônias normalmente são pequenas, translúcidas, opacas, convexas, com bordos arredondados, após quatro a cinco dias de incubação (QUINN et al., 1994; LUCERO et al., 2008).

Outra forma de diagnóstico direto é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que pode identificar, com alta sensibilidade e especificidade, sequências de DNA de *Brucella* spp. (NIELSEN et al., 1998). A PCR pode superar os métodos convencionais de diagnóstico por ser mais rápida, ter maior sensibilidade, alta especificidade e baixo custo (MILLER et al., 1998; NEWBY et al., 2003; ELFAKI et al., 2005). Comparando com outros métodos, a detecção de *Brucella* spp. pela PCR é mais sensível do que a cultura sanguínea e mais específica do que os testes sorológicos (ZERVA et al., 2001). Entretanto, este método de diagnóstico pode apresentar desvantagens, relacionadas à presença de resultados falso positivos, relacionados à presença de contaminantes e à utilização de um primers direcionados a regiões compartilhadas por outros organismos. Ainda, o diagnóstico molecular pode apresentar resultados falso negativos, associados principalmente a presença de agentes inibidores nas amostras (como urina, sangue e escarro), e o alto custo, tanto de reagentes quanto de equipamentos utilizados (FREDRICKS e RELMAN, 1999). No caso da *Brucella* spp., como a bacteremia é intermitente, comumente encontrada nas fases iniciais da infecção, animais infectados podem apresentar resultados negativos na PCR, quando realizada a partir de sangue total.

A caracterização a nível de gênero vem sendo realizada utilizando primers direcionados a regiões altamente conservadas, tais como *Bcsp31* (BAILY et al., 1992), 16s-rRNA (ROMERO et al., 1995), proteínas externas de membrana (OMPs) (BAILY et al., 1992; GUARINO et al., 2000), região intergênica e genes funcionais (DA COSTA, 1996), e o gene ligado à síntese do eritritol (BRICKER e HALLING, 1994). Devido a alta homologia observada no gênero *Brucella*, diversas técnicas têm sido empregadas objetivando encontrar um polimorfismo do DNA, o que poderia permitir a

identificação molecular das diferentes espécies e biovars de *Brucella* spp. (ALLARDET-SERVENT et al., 1988). Verificou-se que os genes que codificam as principais OMPs (omp25, omp31, omp2a e omp2b) são ideais para este objetivo, visto que apresentam polimorfismo suficiente para permitir a diferenciação entre espécies e biovars de *Brucella* spp. (FICHT et al., 1990; CLOECKAERT et al., 1995; CLOECKAERT et al., 1996; FICHT et al., 1996; VIZCAÍNO et al., 1997; VIZCAÍNO et al., 2000).

A dificuldade no isolamento de *Brucella* spp. associada à contaminação por microrganismos oportunistas, bem como a inconsistência observada nos resultados dos PCRs, tem dificultado os estudos epidemiológicos. Frente a isso, tem sido recomendado o uso de métodos indiretos, através da sorologia, a qual apresenta simplicidade na execução, custo acessível, boa sensibilidade e especificidade, e foi desenvolvida com base na dinâmica de formação de anticorpos em resposta à infecção (ALTON et al., 1975; NIELSEN, 1995).

A produção de imunoglobulinas em animais após a infecção por espécies de *Brucella* spp. caracteriza-se pelo aparecimento de quatro isotipos: IgM, IgG, IgG2 e IgA (NIELSEN et al., 2004). Estas imunoglobulinas são dirigidas, em sua grande maioria, contra a cadeia de LPS. A resposta de IgM aparece poucos dias pós-infecção, tendo um rápido aumento, atinge o seu pico próximo à segunda semana e logo declina, permanecendo em níveis detectáveis (NIELSEN et al., 2001). A resposta de IgG segue um padrão parecido, porém com picos mais tardios que IgM (por volta da 4ª semana), permanecendo detectável por longos períodos (NIELSEN et al., 2004). Já a resposta de IgG2 e IgA surge em torno da 2ª semana pós-infecção, apresenta um pequeno aumento, mas permanece em níveis baixos, e como consequência, oferece baixa sensibilidade (CARTER e CHENGAPPA, 1991).

Existe um número considerável de microrganismos que contêm antígenos com epítomos semelhantes aos do LPS encontrada em *Brucella* spp., e a principal resposta humoral a estes antígenos ocorre através da produção do IgM (CORBEL, 1985). Baseado nestas observações e na grande especificidade de ligação que a classe IgG possui com os epítomos do gênero *Brucella* spp., pode-se dizer que este isotipo é o mais importante no diagnóstico sorológico da brucelose (ALLAN et al., 1976; BUTLER et al., 1986; LAMB et al., 1979; MACMILLAN et al., 1990; NIELSEN et al., 1984).

O primeiro relato de diagnóstico sorológico para *Brucella* spp. foi descrito por Wright e Smith (1897), usando um simples teste de aglutinação em tubo (SAT). De lá

para cá, diversas modificações neste teste e vários outros testes foram surgindo afim de aumentar a acurácia, como por exemplo os testes de aglutinação rápida, testes de precipitação, testes de fixação de complemento e testes de ligação primária (NIELSEN e YU, 2010). Mundialmente, diversos testes têm sido utilizados nos estudos da soroprevalência da *Brucella* spp. em equídeos, destacando-se o SAT e o Rosa Bengala em Placa (RBPT) (GÖZ et al., 2007; WADOOD et al., 2009; TAHAMTAN et al., 2010; TEL et al., 2011; EHIZIBOLO et al., 2011; GHOBADI e SALEHI, 2013; SADIQ et al., 2013). No Brasil, de acordo com Ribeiro et al. (2003), os testes mais utilizados nas últimas décadas para a detecção de anticorpos anti-*Brucella* em equinos são o SAT e o 2ME.

3.9 Considerações finais

Embora diversos estudos tenham confirmado a ocorrência de *Brucella* spp. em equídeos de diferentes regiões do mundo, os mesmos, não discutem a participação destes animais nos ciclos de transmissão. Na região do Pantanal, o conhecimento acerca da brucelose equina se torna relevante visto que (i) essa espécie é fundamental e determinante no transporte e no trabalho, e (ii) por compartilharem o ambiente com diferentes espécies com comprovada relevância epidemiológica, como os biungulados domésticos e silvestres, e comprovadamente são hospedeiros acidentais, equinos podem atuar como sentinelas da infecção por *Brucella* spp. na região.

Os capítulos a seguir foram elaborados segundo as normas da seguinte revista científica: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

3.10 Referências

1. ABO-SHEHADA, M. N. Seroprevalence of *Brucella* species in equids in Jordan. **Veterinary Record**, v. 165, n. 9, p. 267-268, 2009.
2. ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. 416p.
3. ACOSTA-GONZALEZ, R. I.; GONZALEZ-REYES, I.; FLORES-GUTIERREZ, G. H. Prevalence of *Brucella abortus* antibodies in equines of a tropical

region of Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 4, p. 302-304, 2006.

4. AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; OKUDA, L. H.; STÉFANO, E.; NASSAR, A. F. C.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do Município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 269-276, 2008.

5. ALI, A. H.; ZAIDAM, W. A.; SHARMA, V. K. Seroprevalence of brucellosis in horses in Iraq. **Indian Veterinary Journal**, v. 62, p. 917- 921, 1985.

6. ALLAN, G.; CHAPPEL, R.; WILLIAMSON, P.; MCNAUGHT, D. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **The Journal of Hygiene**, v. 76, n. 2, p. 287–98, 1976.

7. ALLARDET-SERVENT, A.; BOURG, G.; RAMUZ, M.; PAGES, M.; BELLIS, M.; ROIZES, G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 10, p. 4603–4607, 1988.

8. ALTON, G. G.; MAW, J.; ROGERSON, B. A.; MCPHERSON, G. G. Serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, n. 2, p. 57-63, 1975.

9. ANGEL, M. O.; RISTOW, P.; KO, A. L.; DI-LORENZO, C. Serological trail of *Brucella* infection in an urban slum population in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 9, p. 675-679, 2012.

10. ANTUNES, J. M. A. P.; ALLENDORF, S. D.; APPOLINÁRIO, C. M.; PERES, M. G.; PEROTTA, J. H.; NEVES, T. B.; DECONTO, I.; BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; MEGID, J. Serology for *Brucella abortus* in cart horses from an urban area in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 619- 621, 2013.

11. ARAÚJO, R. R.; PENA, L. J.; PENA, D. A.; DIAS, F. M.; MORAES, M. P. Ocorrência de anticorpos anti- *Brucella* spp. em equídeos da região da zona da mata do estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 681-684, 2009.

12. ARDO, M. B.; ABUBAKAR, D, M. Seroprevalence of horse (*Equus caballus*) brucellosis on the Mambilla plateau of Taraba State, Nigeria. **Journal of Equine Science**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2016.

13. ARRUDA, F. R.; SILVA, M. H.; SOARES FILHO, P. M.; CAMPOS, A. C.; AZEVEDO, E. O. Brucelose equina no Estado da Paraíba. **Medicina Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 7- 10, 2012.

14. BAEK, B. K.; LIM, C. W.; RAHMA, M. S.; KIM, C. H.; OLUOCH, A.; KAKOMA, I. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 4, p. 312–314, 2003.

15. BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 271–275, 1992.

16. BLASCO, J. M.; MOLINA-FLORES, B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America (Food Animal Practice)**, v. 27, n. 1, p. 95–104, 2011.

17. BISLIMOVSKA, J.; MINOV, J.; MIJAKOSKI, D.; STOLESKI, S.; TODOROV, S. Brucellosis as an occupational disease in the Republic of Macedonia. **Macedonian Journal of Medical Science**, v. 3, n. 3, p. 251-256, 2010.
18. BRASIL. **Diagnóstico de Saúde Animal**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 1977. p. 525–602.
19. BRASIL. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal** – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2006.192p.
20. BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; STACK, J. A.; MACMILLAN, A. P.; STAUNTON, N. J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. **The Veterinary Record**, v. 144, n. 17, p. 483, 1999.
21. BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, 1994.
22. BUENO, M. A.; MATHIAS, L. A.; GIRIO, R. J. S. Estudo sorológico sobre a brucelose em equinos no Estado de São Paulo e frequência de aglutinações sensíveis ao 2-Mercaptoetanol e ao ácido etileno diamino tetracético (EDTA). **Ars Veterinaria**, v. 18, n. 3, p. 280-286, 2002.
23. BUTLER, J.; SEAWRIGHT, G.; MCGIVERN, P.; GILSDORF, M. Preliminary evidence for a diagnostic Immunoglobulin G1 antibody response among culture-positive cows vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 and challenge exposed with strain 2308. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 6, p. 1258–64, 1986.
24. CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine Brucellosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 573-584.
25. CARMICHAEL, L. E.; SHIN, S. J. Canine Brucellosis: A diagnostician's dilemma. **Seminars in veterinary medicine and surgery (Small animal)**, v.11, n.3, p.161-165, 1996.
26. CARRIGAN, M. J.; COCKRAM, F. A.; NASH, G. V. *Brucella abortus* biotype 1 arthritis in a horse. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, n. 6, p. 190, 1987.
27. CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991. 286p.
28. CARVALHO, M. S.; BARROSO, M. R.; PINHAL, F.; MOTA TAVARES, F. Brucelose, alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, v. 2, n. 4, p. 259-261, 1995.
29. CASTRO, A. C.; GONZÁLEZ, R. S.; PRAT, I. M. Brucellosis: uma revision practica. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 39, p. 203- 216, 2005.
30. CHAIN, P. S.; COMERCI, D. J.; TOLMASKY, M. E.; LARIMER, F. W.; MALFATTI, S. A.; VERGEZ, L. M., AGUERO, F.; LAND, M. L.; UGALDE, R. A.; GARCIA, E. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8353–8361, 2005.
31. CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 46 - 55. 2009.

32. CLOECKAERT, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; GRÉPINET, O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer membrane proteins of *Brucella*. **Microbiology**, v. 141, n. 1, p. 2111–2121, 1995.
33. CLOECKAERT, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; VIZCAÍNO, N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, n. 1, p. 1–8, 1996.
34. COOK, D. R.; KINGSTON, G. C. Isolation of *Brucella suis* biotype 1 from a horse. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 5, p. 162-163, 1988.
35. CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. Genus *Brucella*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. Baltimore, 1984. p. 377-388.
36. CORBEL, M. J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. **Veterinary Bulletin**, v. 55, p. 927–42, 1985.
37. CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Disease**, v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.
38. CVETNIC, Z.; SPICIC, S.; CURIC, S.; JUKIC, B.; LOJKIC, M.; ALBERT, D.; THIÉBAUD, M.; GARIN-BASTUJI, B. Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. **The Veterinary Record**, v. 156, n. 18, p. 584-585, 2012.
39. DA COSTA, M.; GUILLOU, J. P.; GARIN-BASTUJI, B.; THIÉBAUD, M.; DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 3, p. 267-275, 1996.
40. DAVIS, D. S. Brucellosis in wildlife. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 321-334.
41. DELVECCHIO, V. G.; KAPATRAL, V.; REDKAR, R. J.; PATRA, G.; MUJER, C.; LOS, T.; IVANOVA, N.; ANDERSON, I.; BHATTACHARYYA, A.; LYKIDIS, A.; REZNIK, G.; JABLONSKI, L.; LARSEN, N.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.; MAZUR, M.; GOLTSMAN, E.; SELKOV, E.; ELZER, P. H.; HAQIUS, S.; O'CALLAGHAN, D.; LETESSON, J. J.; HASELKORN, R.; KYRPIDES, N.; OVERBEEK, R. The genome sequence of facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 443-448, 2002.
42. DENNY, H. R. A review of brucellosis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 5, n. 3, p. 121-125, 1973.
43. DÍAZ APARICIO, E. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. **Revue Scientifique et Technique**, v. 32, n. 1, p. 43-51, 53-60, 2013.
44. DORNELES, E. M. S.; FERNANDES, L. G.; SANTANA, J. A.; FREITAS, F. J. C.; LIMA, J. M.; BARROS, I. O.; SAKAMOTO, S. M.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Anti-*Brucella abortus* antibodies in free-ranging equids from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1281-1286, 2013.
45. EHIZIBOLO, D. O.; GUSI, A. M.; EHIZIBOLO, P. O.; MBUK, E. U.; OCHOLI, R. A. Serologic prevalence of brucellosis in horse stables in two northern States of Nigeria. **Journal of Equine Science**, v. 22, n. 1, p. 17-19, 2011.
46. ELFAKI, M. G.; AL-HOKAIL, A.; NAKEEB, S. M.; AL-RABIAH, F. A. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. **Medical science monitor**, v. 11, n. 11, p. 69 – 74, 2005.
47. EFSA. Porcine brucellosis (*Brucella suis*). **European Food Safety Authority Journal**, v. 1144, p. 1–112, 2009.

48. FICHT, T. A., BEARDEN, S. W., SOWA, B. A., MARQUIS, H. Genetic variation of the *omp2* porin locus of the brucellae: species-specific markers. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1135–1142, 1990.
49. FICHT T. A.; HUSSEINEN, H. S.; DERR, J.; BEARDEN, S. W. Species-specific sequences at the *omp2* locus of *Brucella* type strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 329–331, 1996.
50. FLORES-CASTRO, R.; SUAREZ, F.; RAMIREZ-PFEIFFER, C.; CARMICHAEL, D. F.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 591–596, 1977.
51. FOSTER, G.; JAHANS, K. L.; REID, R. J.; ROSS, H. M. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. **The Veterinary Record**, v. 138, n. 24, p. 583-586, 1996.
52. FREDRICKS, D. N.; RELMAN, D. A. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. **Clinical infectious diseases**, v. 29, n. 3, p. 475-486, 1999.
53. FURQUIM, M. E. C.; SOUZA, M. A.; MAGALHÃES, L. F.; WILSON, T. M.; LIMARIBEIRO, A. M. C. Investigaç o da brucelose em equ deos abatidos em frigor fico exportador. **Revista Veterin ria Not cias**, v. 18, n. 2, p. 45-50, 2012.
54. GLYNN, M. K.; LYNN, T. V. Brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 6, p. 900-908, 2008.
55. GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases in Livestock**. Cape Town: Oxford University Press, 2004. p. 1546-1552,
56. GODFROID, J.; AL DAHOUK, S.; PAPPAS, G.; ROTH, F.; MATOPE, G.; MUMA, J.; MARCOTTY, T.; PFEIFFER, D.; SKJERVE, E. A "One Health" surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 241-248, 2013a.
57. GODFROID, J.; GARIN-BASTUJI, B.; SAEGERMAN, C.; BLASCO, J. M. Brucellosis in terrestrial wildlife. **Revue Scientifique Technique**, v. 32, n. 1, p. 27-42, 2013b.
58. GOLDING, B., SCOTT, D. E.; SCHARF, O.; HUANG, L. Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2001.
59. GONÇALVES, D. D.; TELES, P. S.; DOS REIS, C. R.; LOPES, F. M.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; ALVES, L. A.; MULLER, E. E.; DE FREITAS, J. C. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paran  State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de S o Paulo**, v. 48, n. 3, p. 135-40, 2006.
60. GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 281-297, 2002.
61. G Z, Y.; BAB R, C.; AYDIN, A.; KILIÇ, S. Seroprevalence of toxoplasmosis brucellosis and listeriosis in horses in Hakkari, eastern region of Turkey. **Revue de Medicine Veterinaire**, v. 158, n. 11, p. 534-539, 2007.
62. GUARINO, A.; SERPE, L.; FUSCO, G.; SCARAMUZZO, A.; GALLO, P. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. **The Veterinary Record**, v. 147, n. 22, p. 634-636, 2000.

63. GUZMÁN-VERRI, C.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; MORALES, J. A.; BAQUERO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; MORENO, E. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 3, 2012.
64. HALLING, S. M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J.; ZUERNER, R. L.; QING, Z.; LI, L. L.; KAPUR, V.; ALT, D. P.; OLSEN, S. C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 8, p. 2715-2726, 2005.
65. HOLLETT, R. B. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 575-87, 2006.
66. IICAB. 2007. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. **Ovine epididymitis: Brucella ovis**. Disponibilizado em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_ovis.pdf. Acesso em out/2016.
67. JAHANS, K. L.; FOSTER, G.; BROUGHTON, E. S. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 373-382, 1997.
68. JIAN, H. Identification and characterization of 200 strains of *Brucella canis* under test from china. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 32, n. 5, p. 370-375, 1992.
69. JUNQUEIRA, D. G. Jr; DORNELES, E. M.; GONÇALVES, V. S.; SANTANA, J. A.; ALMEIDA, V. M.; NICOLINO, R. R.; SILVA, M. X.; MOTA, A. L.; VELOSO, F. P.; STYNEN, A. P.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Brucellosis in working equines of cattle farms from Minas Gerais State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, n. 3-4, p. 380-385, 2015.
70. KAMATH, P. L.; FOSTER, J. T.; DREES, K. P.; LUIKART, G.; QUANCE, C.; ANDERSON, N. J.; CLARKE, P. R.; COLE, E. K.; DREW, M. L.; EDWARDS, W. H.; RHYAN, J. C.; TREANOR, J. J.; WALLEN, R. L.; WHITE, P. J.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; CROSS, P. C. Genomics reveals historic and contemporary transmission dynamics of a bacterial disease among wildlife and livestock. *Nature Communications*, v. 7, p. 11448, 2016.
71. KEPPIE, J.; WILLIAMS, A. E.; WITT, K; SMITT, H. The role of erythritol in the tissue localization of the brucellae. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 46, p. 104-108, 1965.
72. LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 202-212, 2008.
73. LAMB, V.; JONES, L.; SCHURIG, G.; BERMAN, D. Enzyme linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. **Infection and Immunity**, v. 26, n. 1, p. 240-7, 1979.
74. LANGENEGGER, J.; SZECHY, A. M. Brucelose dos equídeos domésticos: isolamento de *Brucella abortus* de bursites de cernelha no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico Anim**, v. 4, p. 49-63, 1961.
75. LOPES, C. F. A.; MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E. Avaliação soropidemiológica da brucelose em animais e humanos procedentes da zonabragantina no Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p. 429-431, 1999.

76. LUCERO, N. E.; AYALA, S. M.; ESCOBAR, G. I.; JACOB, N. R. Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 4, p. 496-503, 2008.
77. LUCERO, N. E.; CORAZZA, R.; ALMUZARA, M. N.; REYNES, E.; ESCOBAR, G. I.; BOERI, E.; AYALA, S. M. Human Brucella canis outbreak linked to infection in dogs. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 2, p. 280–285, 2010.
78. MACMILLAN, A. P.; GREISSER-WILKE, I.; MOENINNIG, V.; MATHIAS, L. A. A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. **Dtsch Tierärztl Wochenschr**, v. 97, n. 2, p. 83-85, 1990.
79. MAIA, G. R.; ROSSI, C. R. S.; ABBADIA, F.; VIEIRA, D. K.; MORAES, I. A. Prevalência da brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niteroi-RJ. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 425–427, 1999.
80. MAQUART, M.; LE FLÈCHE, P.; FOSTER, G.; TRYLAND, M.; RAMISSE, F.; DJØNNE, B.; AL DAHOUK, S.; JACQUES, I.; NEUBAUER, H.; WALRAVENS, K.; GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; VERGNAUD, G. MLVA-16 typing of 295 marine mammal Brucella isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 145, 2009.
81. MCDONALD, W. L.; JAMALUDIN, R.; MACKERETH, G.; HANSEN, M.; HUMPHREY, S.; SHORT, P.; TAYLOR, T.; SWINGLER, J.; DAWSON, C. E.; WHATMORE, A. M.; STUBBERFIELD, E.; PERRETT, L. L.; SIMMONS, G. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4363–4370, 2006.
82. MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A.; SAMARTINO, L. E. Brucellosis due to *Brucella suis* in a swine herd associated with a human clinical case in the State of São Paulo, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 7, p. 1575-1579, 2012.
83. MEYER, M. E. Metabolic characterization of the genus Brucella. VI. Growth stimulation by erythritol compared with strain virulence for guinea pigs. **Journal of Bacteriology**, v. 93, n. 3, p. 996-1000, 1967.
84. MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1998.
85. MORENO, E. E.; STACKEBRANDT, E.; DORSCH, M.; WOLTERS, J.; BUSCH, M.; MAYER, I. I. *Brucella abortus* 16Sr RNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the α 2 subdivision of the class proteobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 7, p. 3569–3576, 1990.
86. MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. Brucella evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 209-227, 2002.
87. MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 213, 2014.
88. MUNOZ, P. M.; GARCIA-CASTRILLO, G.; LOPEZ-GARCIA, P.; GONZALEZ-CUELI, J. C.; DE MIGUEL, M. J.; MARIN, C. M.; BARBERAN, M.; BLASCO, J. M. Isolation of Brucella species from a live-stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in Spain. **The Veterinary Record**, v. 158, n. 13, p. 450-451, 2006.
89. MUSA, M. T. A serological study on equine brucellosis in Darfur, Western Sudan. **The Sudan Journal of Veterinary Research**, v. 19, n. 2, p. 7-11, 2004.

90. NEWBY, D. T.; HATFIELD, T. L.; ROBERTO, F. F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: A comparative study of SYBR green 1,5'-exonuclease and hybridization probe assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4753-4759, 2003.
91. NICOLETTI, P. L. Relationship between animal and human disease. In: YOUNG, E. J.; CORBEL, M. J. **Brucellosis: clinical and laboratory aspects**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 41-51.
92. NIELSEN, K.; HECK, F.; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, n. 1-4, p. 197-204, 1984.
93. NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 27, p. 9-17, 1995.
94. NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSNGILL, C.; SAMARTINO, L.; PEREZ, B.; COATS, M.; HENNAGER, S.; DAJER, A.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, n. 3-4, p. 321-329, 1998.
95. NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 163-170, 2001.
96. NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 447-459, 2002.
97. NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NICOLLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1-2, p. 25-30, 2004.
98. NIELSEN, K.; YU, W. L. Serological diagnosis of brucellosis. **Prilozi**, v. 31, n. 1, p. 65-89, 2010.
99. NOMURA, A.; IMAOKA, K.; IMANISHI, H.; SHIMIZU, H.; NAGURA, F.; MAEDA, K.; TOMINO, T.; FUJITA, Y.; KIMURA, M.; STEIN, G. H. Human *Brucella canis* infections diagnosed by blood culture. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 1183-1185, 2010.
100. OCHOLI, R. A.; BERTU, W. J.; KWAGA, J. K. P.; AJOGI, I.; BALE, J. O.; OKPARA, J. Carpal bursitis associated with *Brucella abortus* in a horse in Nigeria. **The Veterinary Record**, v. 155, n. 18, p. 566-567, 2004.
101. OHISHI, K.; FUJISE, Y.; MARUYAMA, T. *Brucella* spp. in the western North Pacific and Antarctic cetaceans: a review. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 10, p. 67-72, 2008.
102. OIE. 2010. World Organisation for Animal Health. **Porcine brucellosis, Chapter 2.8.5**. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em: www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.08.05_porcine_bruc.pdf. Acesso em out/2016.
103. OLSEN, S. C.; PALMER, M. V. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 6, p. 1076-1089, 2014.

104. OLIVEIRA, S. C.; SPLITTER, G. A. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. **Vaccine**, v. 14, n. 10, p. 959-62, 1996.
105. OLIVEIRA, S. C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 417-424, 2002.
106. OLIVEIRA, A. L. B. **Detecção e identificação de *Brucella* spp. em *Canis familiaris* e o papel deste hospedeiro na epidemiologia da brucelose no Pantanal Sul-Mato-Grossense**. 2015, xx f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.
107. PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 91–99, 2006.
108. PAPPAS, G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. S8-11, 2010.
109. PAULIN, L. M. Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 239-249, 2003.
110. PINHO, A. P. V. B.; KURODA, R. B. S.; VASCONCELLOS, S. A.; NETO, J. S. F.; OSSADA, R.; DE SOUZA, V. A. F.; ROCHA, K. S.; PAZ, G. S.; MORAES, C. C. G. Estudo sorológico da brucelose e leptospirose em equídeos da ilha de Maiandeuá (Algadoal) no Estado do Pará. **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3221-3230, 2014.
111. POLLOCK, R. V. H. Canine brucellosis: current status. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 1, p. 255–267, 1979.
112. POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 55-62, 2002.
113. QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London, Wolfe Publishing, 1994. 648p.
114. RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. H. **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. London: W.B. Saunders, 2000. 1877p.
115. RAMOS, T. R.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; MOURA SOBRINHO, P. A.; SANTANA, V. L.; GUERRA, N. R.; DE MELO, L. E.; MOTA, R. A. Epidemiological aspects of an infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the microregion of Araguaína, Tocantins. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 133-138., 2008.
116. RANKIN, J. E. Equine brucellosis in north-west England. **Equine Veterinary Journal**, v. 5, n. 3, p. 126-127, 1973.
117. RIBEIRO, M. G.; NARDI JÚNIOR, G.; MEGID, J.; PAES, A. C.; LISTONI, F. J. P. Anti-*Brucella abortus* agglutinins in serum and secretion of fistulous withers in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 99-101, 2003.
118. RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. Equine brucellosis: aspects of the disease in Brazil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 83-92, 2008.
119. RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo, Varela, 2003. 999p.

120. RODRIGUES, A. L.; SILVA, S. K.; PINTO, B. L.; SILVA, J. B.; TUPINAMBÁS, U. Outbreak of laboratory-acquired *Brucella abortus* in Brazil: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 791-794, 2013.
121. ROMERO C.; PARDO, M.; GRILLO, M. J.; DIAZ, R.; BLASCO, J. M.; LOPEZ-GOÑI, I. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3198-3200, 1995.
122. ROUX, J. *Brucella*. In: LE MINOR, L.; VERON, M. **Bactériologie Médicale**. Paris: Flammarion, 1989. p. 651-670.
123. SADIQ, M. A.; TIJJANI, A. N.; AUSWAL, M. S.; MUSTAPHA, A. R.; TIJJANI, A. O. Prevalence of *Brucella* antibodies in donkeys (*Equus asinus*) in Borno and Yobe states, Nigeria. **Sokoto Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 7-12, 2013.
124. SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLECHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRUGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 2, p. 153-156, 2009.
125. SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B. K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 801-808, 2010.
126. SEBEK, Z.; SIXI, W.; STUNZNER, D.; CHARMBOURIS, R.; MORGENSTERN, R. Zur Frage der endemischen Herde der spezifischen Hundebrucellose (*Brucella canis*) in Europe. **Monatshefte für Veterinärmedizin**, v. 38, p. 374-378, 1983.
127. SEIDL, A.; MORAES, A. S.; AGUILAR, R.; SILVA, M. S. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 33, n. 1-4, p. 219-234, 1998.
128. SEN, G. P.; JOSHI, T. P.; SINGH, G. Brucellosis among horses in India: a serological study. **Equine Veterinary Journal**, v. 6, n. 2, p. 94-6, 1974.
129. SEXTON, J.; VOGEL, J. P. Type IVB-secretion by intracellular pathogens. **Traffic**, v. 3, n. 3, p. 178-185, 2002.
130. SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 103-108, 2009.
131. SOHN, A. H.; PROBERT, W. S.; GLASER, C. A.; GUPTA, N.; BOLLEN, A. W.; WONG, J. D.; GRACE, E. M.; MCDONALD, W. C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 485-488, 2003.
132. SPERRY, J. F.; ROBERTSON, D. C. Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. **Journal of Bacteriology**, v. 121, n. 2, p. 619-630, 1975.
133. STASHAK, T. S. **Adam's lameness in horses**. 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2002. 341p.

134. SWAI, E. S.; SCHOONMAN, L. Human brucellosis: seroprevalence and risk factors related to high risk occupational groups in Tanga Municipality, Tanzania. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 4, p. 183–187, 2009.
135. TAHAMTAN, Y.; NAMAVARI, M. M.; AMRABADI, O. R.; TAHAMTAN, M. R. Brucellosis among horses in Shiraz-Iran: a seroprevalence study and control strategy. 13^o Congress on Infectious Disease Abstracts, Poster Presentation, 2008.
136. TAHAMTAN, Y.; NAMAVARI, M. M.; MOHAMMADI, G.; JULA, G. M. Prevalence of Brucellosis in Horse Northeast of Iran. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 7, p. 376-378, 2010.
137. TAYLOR, D. J. Serological evidence for the presence of *Brucella canis* infection in dogs in Britain. **The Veterinary Record**, v. 106, n. 5, p. 102–4, 1980.
138. TEL, O. Y.; ARSERIM, N. B.; KESKIN, O. Seroprevalence of equine brucellosis in Southeast Turkey. **YYU Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 22, n. 3, p. 181–3, 2011.
139. THOMASSIAN A. **Enfermidades dos eqüinos**. São Paulo, Varela, 2005. 573p.
140. TRYLAND, M.; KLEIVANE, L.; ALFREDSSON, A.; KJELD, M.; ARNASON, A.; STUEN, S.; GODFROID, J. Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. **The Veterinary Record**, v. 144, n. 21, p. 588-592, 1999.
141. VAN BRESSEM, M. F.; RAGA, J. A.; DI GUARDO, G.; JEPSON, P. D.; DUISAN, P. J.; SIEBERT, U.; BARRETT, T.; SANTOS, M. C.; MORENO, I. B.; SICILIANO, S.; AGUILAR, A.; VAN WAEREBEEK, K. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 86, n. 2, p. 143–157, 2009.
142. VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A. Bases para a prevenção da brucelose animal. **Comum Cient Fac Med Vet Zootec USP**, v. 1, p. 25-36, 1987.
143. VERGER, J. M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A.; GRAYON, M. *Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 35, p. 292-295, 1985.
144. VIZCAÍNO, N.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A. DNA polymorphism at the *omp-31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. **Microbiology**, v. 143, n. 9, p. 2913–2921, 1997.
145. VIZCAÍNO, N.; CLOECKAERT, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; FERNANDEZ-LAGO, L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1089–1100, 2000.
146. WADOOD, F.; AHMAD, M.; KHAN, A.; GUL, S. T.; REHMAN, N. Seroprevalence of Brucellosis in Horses in and Around Faisalabad. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 196-198, 2009.
147. WHATMORE, A. M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; AL DAHOUK, S.; ZYGMUNT, M. S.; BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; KOYLASS, M. S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, C.; SCHOLZ, H. C.; DICK, E. J. Jr; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, Pt. 12, p. 4120-4128, 2014.
148. WRIGHT, A. E.; SMITH, F. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever. **The Lancet**, v. 1, p. 656–9, 1897.

149. YAMAUCHI, C.; SUZUKI, T.; NOMURA, T.; KUKITA, I.; IWAKI, T. Canine brucellosis in a beagle breeding colony. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 36, n. 2, 175-182, 1974.
150. YOUNG, E. J.; SUVANNOPARRAT, U. Brucellosis outbreak attributed to ingestion of unpasteurized goat cheese. **Archives of Internal Medicine**, v. 135, n. 2, p. 240-243, 1975.
151. ZERVA, L.; BOURANTAS, K.; MITKA, S.; KANSOUZIDOU, A.; LEGAKIS, N. J. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1661 – 1664, 2001.

Capítulo 1

Detection of autochthonous *Brucella* spp. in horses from Brazilian Pantanal wetland

Gabriel Carvalho de Macedo^a, João Bosco Vilela Campos ^a, Heitor Miraglia Herrera^a, Filipe Martins Santos^a, Carina Elisei de Oliveira^a

^a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) – 79117-900 Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

ABSTRACT

Introduction: Unlike most of the hosts of *Brucella* spp., equines do not presents reproductive failures, and therefore, do not have epidemiological role in the transmission. The aim of the study was to detect *Brucella* spp. in equines of Brazilian Pantanal and evaluate the role of these animals in the transmission cycle. **Methods:** Initially, whole blood and serum were collected from 179 horses (categorized according to age and gender), and from positive animals at serological and molecular tests, synovial fluid and splenic puncture samples were collected. Sera were tested by Rose Bengal. Using the gene *bcs₃₁*, molecular test was made from blood, and from synovial fluid and splenic puncture from positive animals in serological and molecular assays. Microbiological diagnosis of positive animals on serological and molecular diagnosis was performed from whole blood, synovial fluid and splenic puncture samples. In order to compare the occurrence in the different groups, we apply statistical analysis using the Chi-square and Yates correction tests. **Results:** The positivity in serological and molecular tests were, respectively, 26.3% (40/152) and 1.7% (3/179). Molecular tests from synovial fluids and splenic punctures were negative and there was no bacterial growth in none of the performed cultures. The occurrence of antibodies against *Brucella* spp. differed statistically, mainly when compared the young males (presented the highest occurrence) with other groups. **Conclusions:** In spite of some authors considered horses as dead end, without epidemiological relevance, in endemic areas, horses may play a role as sentinel hosts, indicating that *Brucella* spp. occur in some species of wild and domestic biungulates.

Keywords: *Brucella* spp. Equines. Pantanal. Dead end. Sentinel host.

INTRODUCTION

Brucellosis is a zoonosis of global distribution, caused by gram-negative, intracellular facultative bacteria that can affect a wide range of domestic and wild animals. Economically, it is a major problem for cattle-producing countries, because it results in the discard of infected animals, the fall in the food-animal-products trade and the prohibition of export. In addition, it is one of the biggest public health problems, especially in developing countries, where the prevalence rates exceed ten cases per 100,000 population, despite the underdiagnosed and under-reported cases⁽¹⁾.

Some researchers have reported the occurrence of *Brucella* spp. in equines, a specie considered an accidental host for some autors, which unlike other species does not present the reproductive disease, and, therefore, does not have an epidemiological role in the transmission⁽²⁾. In these animals, *Brucella* spp. usually causes a chronic disease, and rarely results in clinical signs, such as fistulous withers, a chronic inflammatory disease of the supraspinatus bursa and associated tissues that include singular or multiple draining tracts or diffuse swelling of the withers without drainage⁽³⁾⁽⁴⁾.

Despite the lack of knowledge about the source of infection and the mode of transmission in equines, the cohabitation with cattle and domestic pigs is considered a risk factor, as far, the only isolated species from equines are *B. abortus* and *B. suis*⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾. Horses would be infecting through ingestion of water and food contaminated from vaginal discharges, abortion and placental remnants of infected cows and swines⁽⁵⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

The reproductive disease in most of the infected animals occurs due to the large and extensive replication of *Brucella* spp. in placenta, and this is related to the presence of a four-carbon sugar (erythritol) which serves as growth-stimulatory factor and triggers the expression of virulence traits of these bacteria⁽¹¹⁾. In mares, the absence or low production of erythritol justifies the non-occurrence of reproductive injury, and explains, theoretically, the “dead end” role⁽⁴⁾. However, some authors have described the isolation of *Brucella* spp. from joint tissues and fistulous withers, which suggest that there is another source of contamination related to the horses⁽⁷⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾.

Few scientific studies have attempted to equine brucellosis in Brazil, most of them as serological surveys⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾. There is no molecular diagnosis, and with exception of Ribeiro⁽¹³⁾, no author has attempted to bacterial isolation. In this sense, the present work aims to detect *Brucella* spp. in equines of the southern Pantanal, an endemic area for bovine brucellosis⁽²¹⁾⁽²²⁾.

MATERIAL AND METHODS

Study area and sampling method

The collection of biological samples was carried out in a particular farm located at the central region of Pantanal, Mato Grosso do Sul (Nhecolândia sub-region) (18° 59 '15' 'S, 56° 37' 03 ") during the second half of 2015. The sampling size was determined by a non-probabilistic convenience method⁽²³⁾.

Collection of biological samples

Blood samples were obtained from 179 horses ranging from six months to ten years old, born and raised on the property and classified in four different categories according to sex and age: adult males (41), adult females (94), young males (24) and young females (20). All animals had good body condition and had no suggestive clinical signs of brucellosis.

From each animal, through jugular veinpuncture, it was collected 5 ml of whole blood and 5 ml of sera, conditioned in Ethylene Diamino Tetra Acetate anticoagulant (EDTA) tubes and tubes without anticoagulant, respectively. From positive animals on serological and molecular tests, synovial fluid was collected from radiocarpal joint⁽²⁴⁾, and splenic puncture from the seventeenth intercostal space at the left antimer⁽²⁵⁾. To collect these biological samples, sedation with detomidine hydrochloride (0.03 mg/kg) by intravenous route was required, and at the site of each collection were previously performed trichotomy and asepsis with povidone-iodine and ethanol. These collected materials were subject to DNA extraction through the Phenol-chloroform⁽²⁶⁾ and subsequent molecular analysis, and to microbiological culture. All these procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals from Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), according to protocol no. 021/2015, with permission of the owner.

Serological method

In order to estimate the exposure of horses to *Brucella* spp., the Rosa Bengal test was performed using an inactivated suspension of *Brucella abortus* 1119-3 strain (Tecpar®), stained in rose bengal dye, diluted at 8% in buffer solution and pH at 3.63. The technique was performed according to World Health Organization⁽²⁷⁾.

Molecular method

In order to detect *Brucella*-DNA in the sampled horses, the Polymerase Chain Reaction (PCR) was used as the molecular diagnostic method. Initially it was performed from whole blood samples as a screening. The PCR was also performed from synovial fluid and splenic puncture samples of animals that display positivity in whole blood PCR. The target gene used was a 31-kDa *Brucella* cell surface protein (*bcsp31*), a screening method that identifies the bacteria at the genus level and amplifies a 223 bp product⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾, and as positive control it was used the genomic DNA of *B. abortus* strain 2308.

The PCR reaction was performed in a 30 µl reaction volume containing 0,8 µL of each primer at 0,3 pM, 3 µL of 10X PCR reaction buffer, 1.5 µL of MgCl₂ at 2,5 mM, 0.8 mM of dNTPs at 0,2 mM, 1,5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen®), and 1µL of template DNA at 100 ng/µL. Amplification program consisted of a denaturation step at 95°C for 3 min followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1 min.

After the electrophoresis (one hour at 80/100 volts), PCR products (5 µl) were visualized on 1.5% agarose gel. To measure the molecular weight of the fragments, the 1Kb plus molecular mass marker of 100 to 12000 base pairs (Invitrogen ®) was used. The agarose gel was stained by SYBR® Gold solution for 15 minutes. The bands were visualized under ultraviolet light in transilluminator and photographed using a digital camera interconnected to the AlphaDigidoc system (Gel Documentation & Image Analysis System - Alpha Innotech Corporation ®).

Microbiological method

In order to isolate *Brucella* spp. from the sampled horses, bacterial isolation was performed from whole blood, splenic puncture and synovial fluid from positive animals at molecular test. The biological material, soon after being collected, was seeded in Tryptic Soy Broth (TSB) and plated in Tryptic Soy Agar (TSA) medium (SIGMA-ALDRICH ®), both containing the selective supplement for *Brucella* spp. (FD005-5VL: Polymyxin B Sulphate 2,500 IU, Bacitracin 12,500 IU, Nystatin 50,000 IU, Cycloheximide 50.0 mg, Nalidixic Acid 2.5 mg, Vancomycin 10.0 mg) (HiMEDIA ®) and Amphotericin B at a dose of 0.025 mg / ml. The plates were kept at 37°C in CO₂ atmosphere (10%) and inspected for 45 days.

Statistical analysis

The associations between the positivity in the different diagnostic tests and the different groups of animals were analyzed using univariable analysis by the Chi-square test. In order to

compare the groups to each other, a Yates correction test was performed. Both tests were performed through the R software ®⁽³⁰⁾, assuming a confidence interval of 95%.

RESULTS

An overall occurrence of 26.3% (40/152) and 1.7% (3/179) was observed for serological and molecular tests respectively. There were no amplifications in the PCRs made from synovial fluids and splenic punctures. None of the seropositive animals were PCR-positive and vice-versa. Because of loss of samples during procedures, only 152 serum samples were analyzed.

When animals were divided into categories, it was observed that there was a significant difference between the occurrence of antibodies anti-*Brucella* in different groups (Table 1). Regarding the molecular results of whole blood, the analysis also showed a significant difference, but the software warned to an incorrect approximation of the Chi-square test.

Table 1: Occurrence of antibodies anti-*Brucella* and detection of DNA of *Brucella* spp. in sampled horses born and bred at Brazilian Pantanal, categorized by groups according to age and gender.

Groups	N° of positive animals (%)		Chi-square test	df	p-value
	Rose bengal	<i>bcsp 31</i>			
Adult males	5/26 - 19,2%	2/41 - 4,9%	11,05 ^a - 15,05 ^b	3	0,01143 ^{a*} 0,001773 ^b
Adult females	19/82 - 23,2%	1/94 - 23,2%			
Young males	11/24 - 45,8%	0/24 - 0%			
Young females	5/20 - 25%	0/20 - 0%			

Legend: (a) Serology; (b) Molecular; *: The software warned to an incorrect approximation of the Chi-square test.

When we compared two groups to each other through Yates correction test, we found significant differences in serological values of young males in relation to the other groups, (Table 2).

Table 2: Statistical differences between antibodies anti-*Brucella* occurrences in sampled horses born and bred at Brazilian Pantanal, categorized by groups according to age and sex.

Groups	Yates test	df	p-value
Adult females – Young males	6.76		0.009313
Young females – Young males	5.53	1	0.01862
Adult males – Young males	10.08		0.001497

Regarding the microbiological diagnostic, after 45 days of incubation at 37°C with CO₂ atmosphere (10%), there was no bacterial growth in none of the performed cultures.

DISCUSSION

The present study showed a high exposure rate of equines to *Brucella* spp. in Pantanal (26.3%), if compared to other regions in Brazil⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾. This results can be explained by their cohabitation, not only with populations of domestic cattle and swines, but also with a variety of wild mammal species, that have been reported as hosts of *Brucella* spp. in the studied region⁽³¹⁾⁽³²⁾⁽³³⁾. In fact, due to the seasonal flooding of the plains, as well prolonged dry periods, Pantanal offers conditions that favor the sharing of areas between livestock and sympatric native wildlife⁽³⁴⁾, resulting in an increase of intra and interspecific contact, favoring the pathogen transmission⁽³⁵⁾. In addition, flood periods in Pantanal often interfere in the sanitary cattle management preventing the animals from being driven to the corral and correctly vaccinated, consequently, some bovines may be acting as a source of infection. Thus, the enzooty of *Brucella* spp. in Brazilian Pantanal, involving both livestock and wild animals, becomes a major sanitary problem.

Probably, the higher occurrence of antibodies anti-*Brucella* observed in foals, compared to adult animals, would be associated with a more vigorous and long-lasting immune response in young animals, resulting from recent and successive exposures to abortion products (fetuses and placental remnants) of the infected cattle and swines. Vertical transfer of immunoglobulins related to passive immunity could also be influencing the high prevalence recorded in foals, and, as the animals grow older, the serum concentrations of immunoglobulins decreases over time⁽³⁶⁾.

The results of the serological test reported in the present study may be overestimated due to application of a serological screening test, without a confirmatory test. Rose Bengal detects antigens present in the lipopolysaccharide chain (LPS) of smooth brucellas. False-positive reactions may occur because different microorganisms share the same OPS chain, like *Escherichia coli* O157:H7⁽³⁷⁾, *Pseudomonas maltophilia*⁽³⁸⁾, *Rhizobium leguminosarum*⁽³⁹⁾, *Agrobacterium tumefaciens*⁽⁴⁰⁾, *Ochrobactrum antropi* and *Phyllobacterium* sp.⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾. In addition to these organisms, cross-reactions are often related to *Yersinia enterocolitica* O:9, which, although it is morphologically and biochemically different from *Brucella* spp., has a chemically and serologically indistinguishable LPS chain⁽⁴³⁾. In this sense, serological tests that detect components of the LPS chain lack specificity and are unable to distinguish cross reactions from truly positive reactions, and are recommended only for the screening of animals in

surveillance actions⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾. Despite the care that must be taken in the epidemiological interpretation of our serological results, certainly sampled horses are exposed to *Brucella* spp. in the studied area.

Regarding the molecular diagnosis, the target used in the present study, correspondent to the gene encoding a 31-kDa surface protein (*bcs*p 31) of the genus *Brucella*, has been used as molecular marker since the end of the 80's decade⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾, showing high values of sensitivity and specificity⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾. Alternatively, some authors use the ribosomal gene (16S) as a molecular marker⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾. However, *Brucella* spp. shows genetic similarity with some members of the Brucellaceae family⁽⁵¹⁾, mainly with *Ochrobactrum* spp.⁽⁴²⁾⁽⁵²⁾, so that cross reaction can occur⁽⁴⁹⁾⁽⁵³⁾⁽⁵⁴⁾. Although occasionally *Ochrobactrum* spp. may be related to some pathologies in humans⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾, these bacteria are free-living saprophytes with low virulence, do not replicate within eukaryotic cells⁽⁵²⁾, and there are no reports of the occurrence in horses. Even though the results of the molecular test presented here are related to animals known to be infected, in the case of epidemiological approaches, as horses develop chronic infections with short periods of bacteremias, results of molecular tests from whole blood samples of naturally infected horses may be underestimated.

Indeed, the success of *Brucella* spp. isolation from whole blood samples is extremely variable; positive blood cultures occur in 10 to 70% of suspected cases⁽⁵⁸⁾, and the lower rates of positive blood culture are related to chronic infections, while the higher rates are found in acute infections during the short periods of bacteremia⁽⁵⁹⁾. In fact, bacteremia of *Brucella* spp. is an early event, followed by macrophage invasion and intracellular replication with short and intermittently bacteremia period, and as chronicity is established, bacteremia disappears⁽⁶⁰⁾. Since equines tend to develop a chronic subclinical infection⁽⁸⁾, negative blood culture and PCR results from whole blood are expected.

As *Brucella* spp. replicates in mononuclear phagocyte system cells and presents articular tissue tropism⁽⁶¹⁾, it is expected that positive animals at diagnostic tests present positive bacterial culture from joints and macrophage-rich tissues, such as spleen and lymph nodes. As *Brucella* spp. has the capacity to spread to different systems⁽⁶²⁾, the choice of the best material to be collected for molecular diagnosis and bacterial isolation is a challenge, especially in horses whose pathogenesis of infection is little known.

In natural infections, we hope to find non-agreement between some PCR and serology results⁽⁶³⁾. In fact, the amount of detectable IgG in the serological tests is expected to occur from day 14 post infection. In this sense, during acute phase, characterized by bacteremias and absence of detectable IgG, it is expected positivity in the PCR and negativity in the serology.

On the other hand, with the absence of bacteria in bloodstream of infected animals during chronic phase, characteristics of infections by *Brucella* spp., we can expect negativity in the PCR and positivity in the serology.

In general, domestic and wild ungulates infected by *Brucella* spp. develop reproductive symptoms and eliminate bacteria through abortions and placental remnants⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾. Unlike, equines do not present reproductive disease and, therefore, would not be important as a source of infection, as described by Moreno⁽²⁾. However, infected horses eventually presents intense inflammation of the supraspinous bursa with subsequent abscessation and release of secretion containing the great amount of bacteria⁽⁹⁾. Several authors have described the isolation of *Brucella* spp. from fistulous withers, and this must be taken into account as factor of environmental contamination⁽³⁾⁽¹³⁾⁽⁶¹⁾⁽⁶⁷⁾.

It is known that unusual host species may act as sentinels of some bacterial and protozoa infections in endemic areas. Higher seroprevalences of *Rickettsia rickettsii* (Spotted fever agent) in horses indicate that it may act as a sentinel for infection to humans⁽⁶⁸⁾. Equines are also used as sentinels for *Leishmania brasiliensis* in endemic areas for tegumentary leishmaniasis⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾. In addition, in the epidemiology of Chagas disease, the detection of seropositive dogs for *Trypanosoma cruzi* alerts for the risk to infection in humans⁽⁷¹⁾⁽⁷²⁾. In this sense, equines can play a role of sentinel hosts for *Brucella* spp., mainly in endemic regions as the Brazilian Pantanal.

CONCLUSION

According to our results, in southern Pantanal, horses are exposed and can be infected by *Brucella* spp. Because we did not identify any symptomatic animal and did not isolated *Brucella* spp. from positive horses, we agree with other authors, that horses do not present epidemiological importance. However, in some circumstances, horses are able to act as sentinels of the infection.

REFERENCES

1. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 91–99.
2. Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol* 2014; 13: 213.

3. Cohen ND, Carter GK, Mullan WC. Fistulous withers in horses: 24 cases (1984-1990). *J Am Vet Med Assoc* 1992; 201: 121-124.
4. Ribeiro MG, Motta RG, Almeida CAS. Equine brucellosis: aspects of the disease in Brazil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2008; 32: 83-92.
5. Cook DR, Kingston GC. Isolation of *Brucella suis* biotype 1 from a horse. *Aust Vet J* 1988; 65: 162-163.
6. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect* 2008; 136: 496-503.
7. Cvetnic Z, Spicic S, Curic S, Jukic B, Lojkic M, Albert D, et al. Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Vet Rec* 2005; 156: 584-585.
8. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2001.
9. Castro AC, González RS, Prat IM. Brucellosis: uma revisão pratica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2005; 39: 203- 216.
10. Langenegger J, Szechy AM. Brucelose dos equídeos domésticos: isolamento de *Brucella abortus* de bursites de cernelha no Brasil. *Arq Inst Biol Anim* 1961; 4: 49-63.
11. Petersen E, Rajashekara G, Sanakkayala N, Eskra L, Harms J, Splitter G. Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis*. *Microbes Infect* 2013; 15: 440-449.
12. Carrigan MJ, Cockram FA, Nash GV. *Brucella abortus* biotype 1 arthritis in a horse. *Aust Vet J* 1987; 64: 190.
13. Ribeiro MG, Nardi Júnior G, Megid J, Paes AC, Listoni FJP. Anti- *Brucella abortus* agglutinins in serum and secretion of fistulous withers in horses. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2003; 55: 99-101.
14. Ocholi RA, Bertu WJ, Kwaga JKP, Ajogi I, Bale JO, Okpara J. Carpal bursitis associated with *Brucella abortus* in a horse in Nigeria. *Vet Rec* 2004; 155: 566-567.
15. Bueno MA, Mathias LA, Girio RJS. Estudo sorológico sobre a brucelose em equinos no Estado de São Paulo e frequência de aglutinações sensíveis ao 2-Mercaptoetanol e ao ácido etileno diamino tetracético (EDTA). *Ars Veterinaria* 2002; 18: 280-286.
16. Aguiar DM, Cavalcante GT, Lara MCCSH, Villalobos EMC, Cunha EMS, Okuda LH, et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do Município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2008; 45: 269-276.

17. Araujo RR, Pena LJ, Pena DA, Dias FM, Moraes MP. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella* spp. em equídeos da região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Arq Inst Biol.* 2009; 76: 681-684.
18. Antunes JMAP, Allendorf SD, Appolinário CM, Peres MG, Perotta JH, Neves TB, et al. Serology for *Brucella abortus* in carthorses from an urban area in Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013; 65: 619- 621.
19. Dornerles SEM, Fernandes LG, Santana JA, Freitas FJC, de Lima JM, Barros IO, et al. Anti-*Brucella abortus* antibodies in free-ranging equids from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. *Semina Cienc. Agrárias* 2013; 34: 1281-1286.
20. Junqueira DG Jr, Dorneles EM, Gonçalves VS, Santana JA, Almeida VM, Nicolino RR, et al. Brucellosis in working equines of cattle farms from Minas Gerais State, Brazil. *Prev Vet Med* 2015; 121: 380-385.
21. Chate SC, Dias RA, Amaku M, Ferreira F, Moraes GM, Costa Neto AA, et al. Epidemiological situation of bovine brucellosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61: 46-55.
22. Negreiros RL, Dias RA, Ferreira F, Ferreira Neto JS, Gonçalvez VSP, Silva MCP, et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61: 56-65.
23. Schiffman L, Kanuk L. Comportamento do consumidor. Rio de Janeiro: LTC Editora; 2004.
24. Stashak TS. Adam's lameness in horses. Philadelphia: Willians & Wilkins; 2002.
25. Souza MVM, Moreira MAB, Corrêa RR, Rocanti NV. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. Associação brasileira dos médicos veterinários de equídeos – ABRAVEQ 2007. Available in: www.abraveq.com.br/novo_2007/artigo_0009.html. Access in: 20/07/16.
26. Sambrook J, Russel DW. Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J, Russel DW, editors. *Molecular cloning: New York: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory; 2001. p. 631-632.
27. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Laboratory Techniques in Brucellosis.* Geneva: World Health Organization; 1975.
28. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 1992; 95: 271–275.

29. Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, Crosby RM, Knight DJ, Halling SM, et al. The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene* 1988; 63: 1-9.
30. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2011. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
31. Schabib Péres IAHF. Ocorrência e Associação da Brucelose com as Taxas de Fêmeas de Veado-Campeiro (*Ozotoceros Bezoarticus*) Encontradas Sem Filhotes na Nhecolândia, Corumbá, MS. [Master's Dissertation]. [Campo Grande]. *Ciência Animal*. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS; 2010. 87 p.
32. Zimmermann NP. Evidência Epidemiológica de *Brucella* sp em Bovinos e Veado-Campeiros (*Ozotoceros Bezoarticus*) em Simpatría no Pantanal de Mato Grosso do Sul. [Master's Dissertation]. [Campo Grande]. *Ciência Animal*. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS; 2012. 45 p.
33. Dorneles EMS, Pellegrin AO, Schabib-Péres IAHF, Mathias LA, Mourão G, Bianchi RC, et al. Serology for brucellosis in free-ranging crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and brown-nosed coatis (*Nasua nasua*) from Brazilian Pantanal. *Ciência Rural* 2014; 44: 2193-2196.
34. Harris M, Tomás W, Mourão G, Da Silva ACJ, Guimarães E, Sonoda F, et al. Safeguarding the Pantanal wetlands: threats and conservation initiatives. *Conservation Biology* 2005; 19: 714-720.
35. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 2000; 287: 443-449.
36. Lunn DP, Horohov DW. The equine immune system. In: Reed S, Bayly W, Sellon DC, editors. *Equine Internal Medicine*. St. Louis: Saunders Elsevier; 2010. p. 1-56.
37. Stuart FA, Corbel MJ. Identification of a serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* 0157. *Vet Rec* 1982; 110: 202–203.
38. Di Fabio JL, Perry MB, Bundle DR. Analysis of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas maltophilia* 555. *Biochem Cell Biol* 1987; 65: 968–977.
39. Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt MS. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 627–629.
40. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. by using polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2099–2101.

41. Triplett EW, Breil BT, Splitter GA. Expression of tfx and sensitivity to the rhizobial peptide antibiotic trifolixin in a taxonomically distinct group of alpha-proteobacteria including the animal pathogen *Brucella abortus*. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4163–4166.
42. Velasco J, Romero C, López-Goñi I, Leiva J, Díaz R, Moriyón I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 759-768.
43. Zaccheus MV, Ali T, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Weintraub A, Iriarte M, et al. The epitopic and structural characterization of *Brucella suis* biovar 2 O-polysaccharide demonstrates the existence of a new M-negative C-negative smooth *Brucella* serovar. *Plos One* 2013; 8: e53941.
44. European Food Safety Authority. Opinion of the Panel of Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA J* 2009; 1144: 1–112.
45. World Organization for Animal Health. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris: International Office of Epizootics; 2012.
46. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between Light Cycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 260-264.
47. Wang Y, Wang Z, Zhang Y, Bai L, Zhao Y, Liu C, et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13: 31.
48. Zamanian M, Hashemi Tabar GR, Rad M, Haghparast A. Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method. *Arch Iran Med* 2015; 18: 44-50.
49. Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 615-617.
50. Fox KF, Fox A, Nagpal M, Steinberg P, Heroux K. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3217-3222.
51. Barquero-Calvo E, Conde-Alvarez R, Chacón-Díaz C, Quesada-Lobo L, Martirosyan A, Guzmán-Verri C, et al. The differential interaction of *Brucella* and *Ochrobactrum* with

- innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens. PLoS One 2009; 4: e5893.
52. Scholz HC, Pfeffer M, Witte A, Neubauer H, Al Dahouk S, Wernery U, et al. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the *recA* gene. J Med Microbiol 2008; 57: 64-71.
 53. Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiébaud M, Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. J Appl Bacteriol 1996, 81: 267-275.
 54. Scholz HC, Tomaso H, Al Dahouk S, Witte A, Schloter M, Kämpfer P, et al. Genotyping of *Ochrobactrum anthropi* by *recA*-based comparative sequence, PCR-RFLP, and 16S rRNA gene analysis. FEMS Microbiol Lett 2006; 257: 7-16.
 55. Cieslak TJ, Drabick CJ, Robb ML. Pyogenic infections due to *Ochrobactrum anthropi*. Clin Infect Dis 1996; 22: 845-847.
 56. Elsaghir AA, James EA. Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by API 20NE. J Med Microbiol 2003; 52: 441-442.
 57. Ozdemir D, Soypacaci Z, Sahin I, Bicik Z, Sencan I. *Ochrobactrum anthropi* endocarditis and septic shock in a patient with no prosthetic valve or rheumatic heart disease: case report and review of the literature. Jpn J Infect Dis 2006; 59: 264-265.
 58. Alikhani MY, Hasemi SH, Naseri Z, Farajnia S, Peeri-Dogaheh H. Diagnosis of human brucellosis by blood culture (BACTEC) and PCR method via whole blood and serum. Jundishapur J Microbiol 2013; 6: 248-251.
 59. Pappas G, Papadimitriou P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. Int J Antimicrob Agents 2007; 30: S29-31.
 60. Nielsen K, Duncan JR. Animal brucellosis. Boca Raton: CRC Press; 1990.
 61. Paulin LM. Brucelose. Arq Inst Biol São Paulo 2003; 70: 239-249.
 62. Young EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 1995, 21: 283–290.
 63. Herrera HM, Dávila AM, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS, et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. Vet Parasitol 2004; 125: 263-275.
 64. Forbes LB, Tessaro SV. Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. J Am Vet Med Assoc 1993; 203: 289-294.
 65. Garin-Bastuji B, Hars J, Calvez D, Thiebaud M, Artois M. Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. Epidémiologie Santé Animale 2000; 38: 1–5.

66. Godfroid J, Garin-Batuji B, Saegerman C, Blasco JM. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Rev Sci Tech* 2013; 32: 37-42.
67. Portugal MA, Nesti A, Giorgi W, França EN, de Oliveira BS Jr. Brucellosis in equins caused by *Brucella suis*. *Arq Inst Biol São Paulo* 1971; 38: 125-132.
68. Souza CE, Camargo LB, Pinter A, Donalisio MR. High Seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in equines suggests risk of human infection in silent areas for the Brazilian Spotted Fever. *PLoS One* 2016; 11: e0153303.
69. Aguilar CM, Rangel EF, Deane LM. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 471-472.
70. Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Rangel E, Schubach A, Grimaldi Júnior G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 427-435.
71. Castañera MB, Lauricella MA, Chuit R, Gürtler RE. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 671-683.
72. Castillo-Neyra R, Chou Chu L, Quispe-Machaca V, Ancca-Juarez J, Malaga Chavez FS, Bastos Mazuelos M, Naquira C, et al. The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev Vet Med* 2015; 120: 349-356.

Capítulo 2

Maintenance of *Brucella* spp. in the Pantanal floodplain by a complex reservoir system

Gabriel Carvalho de Macedo^a, Grasiela Porfilio^a, Filipe Martins Santos^a, Carina Elisei de Oiveira^a, Heitor Miraglia Herrera^a

^a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) – 79117-900 Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

ABSTRACT

Brucellosis is a worldwide disease known to infect a wide range of mammal species, causing economic losses in cattle production and a debilitating disease in humans. The aim of this review was to compile information about the occurrence of *Brucella* spp. in wild and domestic mammals from Brazilian Pantanal, as well as discuss the importance of the infected animal species in the enzootic scenario. For this, it was made a search in different scientific bases: Pubmed, SciELO, Web of Science and Scholar Google. This data survey revealed the occurrence of *Brucella* spp. in six wild hosts: feral pig (*Sus scrofa*), white-lipped peccary (*Tayassu peccary*), collared peccary (*T. tajacu*), pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and coati (*Nasua nasua*); and in two domestic hosts: bovines and dogs. The feral pigs seems to assume great importance in the enzootia of *Brucella* spp. in the region due to their large populations, sharing of habitats with cattle, acting as a hunting species and eating habits associated with necrophagy. Due to the constant cohabitation between different hosts species in the Pantanal region, it is difficult to determine the transmission routes of *Brucella* spp., if from domestic to wild species or vice-versa. This situation results in a threat for conservation of sympatric wildlife and livestock. We conclude that the holistic approach is necessary to understand this enzootic situation. Moreover, the management of brucellosis at the wildlife–livestock interface in endemic areas with abundant livestock and wildlife populations, as a case of Brazilian Pantanal, is in essence much more difficult from mitigating transmission of a given *Brucella* species within its preferential host species, in exclusive areas of cattle raising for example.

Keywords: *Brucella*. Pantanal. Wild hosts. Cohabitation

INTRODUCTION

Brucellosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella*. In spite of their importance in the public health, this disease is the cause of significant economic losses in livestock production due to reproductive disorders. The *Brucella* genus belongs to the Alphaproteobacteria class and Brucellaceae family, and comprises eleven different species: *B. abortus* (bovine brucellosis); *B. suis* (responsible for swine brucellosis); *B. ovis* (brucellosis in sheep); *B. melitensis* (the main etiological agent of brucellosis in humans and small ruminants); *B. ceti* and *B. pinnipedialis* (isolated from marine mammals); *B. microti* and *B. neotomae* (isolated from wild rodents); *B. canis* (canine brucellosis agent); *B. inopinata* (isolated from a mammary implant) and *B. papionis* (isolated from baboons)⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾. There is no host specificity and almost all *Brucella* species seems to have a strong host preference, evidenced by their ability to maintain transmission and infection in populations of specific animal species⁽⁵⁾.

Different *Brucella* species has been isolated from a wide variety of wild mammals, including the American bison (*Bison bison*); the muskox (*Ovibos moschatus*); the red deer (*Cervus elaphus canadenses*); the moose (*Alces alces*); the reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*); the barren-ground caribou (*Rangifer tarandus groenlandicus*); the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*); the European roe deer (*Capreolus capreolus*); the chamois (*Rupicapra rupicapra*); the African buffalo (*Syncerus caffer*); the impala (*Aepyceros melampus*); the waterbuck (*Kobus elipsiprymnus*); the red fox (*Vulpes vulpes*); the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*); the South-American gray fox (*Lycalopex griséus*); the racoon (*Procyon lotor*); the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*); the European hare (*Lepus europaeus*); the wild boar (*Sus scrofa*); and the capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*)⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

Anthropogenic actions such as hunting, environmental contamination and exploration of natural resources interfere with the transmission cycles and infection rates of *Brucella* spp. in their different species of hosts. Mainly, habitat reduction promotes increase in density of wildlife in the remaining areas, causing stress, malnutrition, and immunosuppression, consequently, favoring the transmission among infected and non-infected animals.

The ability to infect a wide range of mammalian hosts makes *Brucella* spp. a major problem in areas shared by wildlife and livestock. In these areas, the introduction of cattle favored the transmission of pathogens to the native fauna (*spill over*); posteriorly the wild animals became a source of infection for production animals (*spill back*)⁽⁸⁾. This is the case, for example, of the historical transmission cycle of *Brucella* spp. among the cattle, deer and bison populations that inhabit Yellowstone Park in the United States and guarantee the maintenance of this pathogen in this region⁽⁹⁾. Similarly, this multi-host infectious agent find in the Brazilian

Pantanal excellent conditions for its replication and perpetuation, as the extensive livestock activity that promotes overlap between livestock and wildlife with sharing of resources⁽¹⁰⁾. Moreover, the alternation of flood and dry periods increase the contact between potential hosts⁽¹¹⁾. In this scenario, although several countries have implemented programs to control and eradicate brucellosis, the presence of wild reservoirs hosts contributes to the perpetuation of the enzootiology⁽⁷⁾. The present study aims to compile information about the occurrence of *Brucella* spp. in Brazilian Pantanal and to evaluate the epidemiological status of the host species.

OVERVIEW ON *BRUCELLA* spp. IN BRAZILIAN PANTANAL

To date, 13 studies, including published articles, dissertations, theses, graduation works and conference papers brings information about the occurrence of *Brucella* spp. in Brazilian Pantanal. This occurrence was detected by serological and molecular tests in different host species, with different prevalence values (Table 1 and Table 2).

Table 1: Serological diagnostic of *Brucella* spp. in different mammal species in Brazilian Pantanal, Mato Grosso do Sul.

Hosts	Methods	Seroprevalence	References
Bovine	RB / 2ME	27.3% / 19%	Zimmermann (2012) ⁽¹²⁾
	RB	12.6%	Chate et al. (2009) ⁽¹³⁾
	RB / 2ME	1.4%	Pellegrin et a. (2006) ⁽¹⁴⁾
	RB / ACL	10.8%	Tocantins et al. (2000) ⁽¹⁵⁾
	RB / 2ME	8.9%	Filho (2013) ⁽¹⁶⁾
	RB / 2ME	7.9%	Negreiros et al. (2009) ⁽¹⁷⁾
	RB / 2ME	11%	Furtado et al. (2015) ⁽¹⁸⁾
Feral pig (<i>Sus scrofa</i>)	RB	16.6%	Custódio (2013) ⁽¹⁹⁾
Pampas deer (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>)	RB / 2ME	10.17% / 3.4%	Schabib Péres (2010) ⁽²⁰⁾
	RB / 2ME	10.17% / 3.4%	Zimmermann (2012) ⁽¹²⁾
Dog	RB / IDGA	10.2% / 6.8%	Oliveira 2015 ⁽²¹⁾
	RB / 2ME	9.1%	Furtado et al. (2015) ⁽¹⁸⁾
Crab-eating fox (<i>Cerdocyon thous</i>)	RB / FPA	13.2%	Dorneles et al. (2014a) ⁽²²⁾
Coati (<i>Nasua nasua</i>)	RB / FPA	8.8%	Dorneles et al. (2014a) ⁽²²⁾

Legend: RB: Rose Bengal; FPA: Fluorescence Polarization Assay; 2ME: 2-Mercaptoetanol; SLA: Smooth Layer Antigen; AGID: Agar Gel Immunodiffusion.

Table 2: Different target genes used in molecular assays for *Brucella* spp. Detection from whole blood samples of different mammal species from Brazilian Pantanal, Mato Grosso do Sul.

Hosts	Target genes	Prevalence	References
Bovine	<i>bcbp31</i>	15.1%	Zimmermann (2012) ⁽¹²⁾
Feral pig (<i>Sus scrofa</i>)	<i>IS711</i> <i>omp31</i>	66.6% 86.6%	Custódio (2013) ⁽¹⁹⁾
White-lipped peccary and Collared peccary <i>T. peccari</i> e <i>T. tajacu</i>	<i>IS711</i>	22.6%	Real (2009) ⁽²³⁾
Pampas deer <i>Ozotoceros bezoarticus</i>	<i>virB5</i>	20.4%	Elisei et al. (2010) ⁽²⁴⁾
	<i>IS711</i>	11%	Schabib Pères (2010) ⁽²⁰⁾
	<i>bcbp31</i>	5.1%	Zimmerman (2012) ⁽¹²⁾
Dog	<i>omp31</i>	10.7%	Oliveira (2015) ⁽²¹⁾
	<i>bcbp31</i>	43.4%	

Legend: *bcbp31*: “Brucella cell surface protein of 31 k-Da; *IS711*: Insertion region on the genome; *omp31*: “Outer membrane protein”; *virB5*:

Probably *Brucella* spp. was introduced in the Pantanal region together with cattle and domestic swine, by the settlers in the late XVIII century. The presence of microorganisms, originally associated with domestic animals in wild animals mainly occurs due to a phenomenon known as “*spill over*”, dispersion of parasites from introduced domestic animals to local wildlife. After establishment of a pathogen in new autochthonous host-species, these populations become a source of infection to production animals (“*spill-back*”)⁽⁸⁾⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾. This phenomenon is highly favored by the seasonal climatic alternation present in Pantanal region, since in the dry period the animals concentrate in a few places where water is available, while in the flood period the animals remain in non-floodable areas. As the transmission of *Brucella* spp. is density-dependent, both situations contribute significantly to the infection of susceptible animals⁽²⁷⁾.

The occurrence of *Brucella* spp. in Pantanal was reported, until now, in six wild mammals species (feral pig, white-lipped peccary, collared peccary, pampas deer, coati and crab-eating fox) and in two species of domestic animals (bovine and dog), and, respecting the competences of each host species, it can be predict that *Brucella* spp. has its permanence guaranteed in the environment of Pantanal. However, the role and importance of each mammalian specie in the dispersion and maintenance of a microorganism can be extremely variable⁽²⁸⁾. In addition, different individuals may have different competence in maintenance and transmission, depending on circumstantial factors related to individual health status, concomitant infections, physical condition and/or stress caused by unfavorable environmental conditions⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾. In this

way, different host-species responsible for maintaining a pathogen in natural environment, on a single space-time scale, composes a reservoir system⁽³⁰⁾⁽³¹⁾.

Within this context, the populations of bovine, feral pigs and pampas deer are of great importance as host-maintainers of *Brucella* spp. enzooty in Pantanal, since (i) they have a large population density⁽³²⁾⁽³³⁾; (ii) eliminate *Brucella* spp. through liquid and placental remnants from abortion⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾; (iii) have high serologic and molecular prevalences⁽²⁴⁾⁽¹²⁾⁽¹⁹⁾; (iv) share the same habitats for foraging and shelter⁽³²⁾⁽³³⁾.

Due to the large populations and their general food habits⁽³³⁾⁽³⁶⁾, feral pigs acquire an important role as an amplifier host of *Brucella* spp. in the Pantanal ecosystem. In fact, feral pigs would becoming infected, besides the foraging in an infected grass and water, through the predation of small animals and the consumption of animal carcasses, including dead cattle and newborn calves⁽³⁷⁾. All those scenarios reflect the high serological and molecular prevalence of *Brucella* spp. in this alien host species⁽¹⁹⁾.

The high seroprevalence of *Brucella* spp. recorded in coatis and crab-eating foxes is certainly influenced by infected sympatric cattle and wild ungulates that eliminate the bacteria in the environment. Coatis and crab-eating foxes are extremely generalist concern their diet, including fetuses aborted by other species of animals⁽³⁸⁾⁽²²⁾. In addition, these two species can use the grasslands to forage, and in the case of coatis, the lagoon borders⁽³⁹⁾, humid places with excellent conditions for the survival of *Brucella* spp.⁽⁴⁰⁾. Although the pathogenesis of *Brucella* spp. in species of wild carnivores is poorly described, the infection registered in meso-carnivores in Pantanal can represent a danger to the conservation of free-living populations. Moreover, predation is a confirmed route of transmission for carnivores⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾.

Domestic dogs are commonly used in Pantanal farms, dealing with cattle and in subsistence hunting, often traveling long distances between different properties. Although it is the natural host of *B. canis*, dog can be infected by *B. suis*, *B. melitensis*, and *B. abortus*⁽⁴³⁾. It has been reported the environmental contamination by dogs infected with *Brucella* spp. through urine, in addition to abortions⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾. As these animals are often fed with raw bovine and feral pigs meat, higher molecular and serological prevalences are expected⁽²¹⁾. Indeed, several studies report the occurrence of *Brucella* spp. in farm dogs, highlighting the importance of this host in the maintenance and dissemination of this pathogen⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾.

CONCLUSION

As wild mammals and livestock cohabit in the Pantanal floodplain, it is difficult to determine which are the transmission routes of *Brucella* spp., if from livestock to wild hosts or

vice versa. In this sense, control and eradication strategies directed only to livestock would not be effective. Therefore, there is a need for a holistic approach (One Health), observing the involving of both animal, environmental and human health.

REFERENCES

1. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. Genus *Brucella*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984. p. 377-388.
2. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. *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* 2007; 57: 2688-2693.
3. Hubálek Z, Scholz HC, Sedlacek I, Melzer F, Sanogo YO, Nesvadbová J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7: 679–687.
4. Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64: 4120-4128.
5. Glynn MK, Lynn TV. Brucellosis. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 900-908.
6. Davis DS. Brucellosis in wildlife. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 321-334.
7. Godfroid J, Garin-Batuji B, Saegerman C, Blasco JM. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Rev Sci Tech* 2013; 32: 37-42.
8. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 2000; 287: 443-449.
9. Kamath PL, Foster JT, Drees KP, Luikart G, Quance C, Anderson NJ, et al. Genomics reveals historic and contemporary transmission dynamics of a bacterial disease among wildlife and livestock. *Nature Communications* 2016; 7: 11448.
10. Van Campen H, Rhyan J. The role of wildlife in diseases of cattle. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)* 2010; 26: 147–161.
11. Harris M, Tomás W, Mourão G, Da Silva ACJ, Guimarães E, Sonoda F, et al. Safeguarding the Pantanal wetlands: threats and conservation initiatives. *Conservation Biology* 2005; 19: 714-720.
12. Zimmermann NP. Evidência Epidemiológica de *Brucella* sp em Bovinos e Veados-Campeiros (*Ozotoceros Bezoarticus*) em Simpatria no Pantanal de Mato Grosso do Sul.

- [Master's Dissertation]. [Campo Grande]: Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS; 2012. 45p.
13. Chate SC, Dias RA, Amaku M, Ferreira F, Moraes GM, Costa Neto AA, et al. Epidemiological situation of bovine brucellosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61: 46-55.
 14. Pellegrin AO, Leite RMH, Sereno JRB, Lage AP, Leite RC, Ravaglia E. Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares. Corumbá: Comunicado Técnico Embrapa 2006; 58: 1-4.
 15. Tocantins S, Cintra R, Frieiro-Costa FA. Distribuição espacial da brucelose no gado bovino do Pantanal, Cáceres, MT. *In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal – Os desafios do novo milênio*. Corumbá: Embrapa, 2000.
 16. Filho JML. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Mato Grosso do Sul. [Master's Dissertation]. [Campo Grande]: Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS; 2013. 85p.
 17. Negreiros RL, Dias RA, Ferreira F, Ferreira Neto JS, Gonçalves VSP, Silva MCP, et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61: 56-65.
 18. Furtado MM, Gennari SM, Ikuta CY, Jácomo AT, de Moraes ZM, Pena HF, et al. Serosurvey of smooth *Brucella*, *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) and domestic animals from Brazil. *PLoS One* 2015; 10: e0143816.
 19. Custódio MS. Identificação molecular de *Brucella* spp. em porcos-monteiros (*Sus scrofa*) provenientes do Pantanal Sul-Mato-Grossense. [Master's Dissertation]. [Campo Grande]: Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS; 2013. 59p.
 20. Schabib Péres IAHF. Ocorrência e Associação da Brucelose com as Taxas de Fêmeas de Veado-Campeiro (*Ozotoceros Bezoarticus*) Encontradas Sem Filhotes na Nhecolândia, Corumbá, MS. [Mater's Dissertation]. [Campo Grande]: Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS; 2010. 87p.
 21. Oliveira ALB. Detecção e identificação de *Brucella* spp. em *Canis familiaris* e o papel deste hospedeiro na epidemiologia da brucelose no Pantanal Sul-Mato-Grossense. [Mater's Dissertation]. [Campo Grande]: Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária. Universidade Católica Dom Bosco – UCDB; 2015. xxp.
 22. Dorneles EMS, Pellegrin AO, Schabib-Péres IAHF, Mathias LA, Mourão G, Bianchi RC, et al. Serology for brucellosis in free-ranging crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and

- brown-nosed coatis (*Nasua nasua*) from Brazilian Pantanal. *Ciência Rural* 2014a; 44: 2193-2196.
23. Real VV. Ocorrência de microrganismos patogênicos em taiassuídeos de cativeiro e vida livre. [Mater's Dissertation]. [Cuiabá]: Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT; 2009. 46p.
 24. Elisei C, Pellegrin AO, Tomas WM, Soares CO, Araújo FR, Funes-Huacca ME, et al. Molecular evidence of *Brucella* sp. in deer (*Ozotoceros bezoarticus*) of southern Pantanal. *Pesq Vet Bras* 2010; 30: 503-509.
 25. Meseko CA, Egbetade AO, Fagbo S. Ebola virus disease control in West Africa: an ecological, one health approach. *Pan Afr Med J* 2015; 21: 6.
 26. Millán J, López-Bao JV, García EJ, Oleaga Á, Llaneza L, Palacios V, et al. Patterns of Exposure of Iberian Wolves (*Canis lupus*) to Canine Viruses in Human-Dominated Landscapes. *Ecohealth* 2015; 13: 123-134.
 27. Crawford RP, Huber JD, Adams BS. Epidemiology and surveillance. *In*: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 131-151.
 28. Jansen AM, Roque ALR. Domestic and wild mammalian reservoir. *In*: Telleria J, Tibayrene M, editors. *American Trypanosomiasis Chagas Disease – One Hundred Years of Research*. London: Elsevier; 2010. p. 249-276.
 29. Botero A, Thompson CK, Peacock CS, Clode PL, Nicholls PK, Wayne AF, et al. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*). *Int J Parasites Wildl* 2013; 29: 77-89.
 30. Ashford RW. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91: 693-702.
 31. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1468–1473.
 32. Mourão GM, Coutinho ME, Mauro RA, Tomás WM, Magnusson W. Levantamento aéreo de espécies introduzidas no Pantanal: porco ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos. Corumbá: Embrapa Pantanal; 2002. 22p.
 33. Desbiez ALJ, Bodmer RE, Tomas WM. Mammalian densities in a Neotropical Wetland subject to extreme climatic events. *Biotropica* 2010; 42: 372-378.
 34. Forbes LB, Tessaro SV. Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 289-94.

35. Garin-Bastuji B, Hars J, Calvez D, Thiebaud M, Artois M. Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. *Epidémiologie Santé Animale* 2000; 38: 1–5.
36. Galetti M, Camargo H, Siqueira T, Keuroghlian A, Donatti CI, Jorge ML, et al. Diet Overlap and Foraging Activity between Feral Pigs and Native Peccaries in the Pantanal. *PLoS One* 2015; 10: e0141459.
37. Piovezan U. O porco monteiro do Pantanal, Brasil. *In*: Silva FOL, editor. *Laz razas porcinas Iberoamericanas: um enfoque etnozootécnico*. Salvador: Instituto Federal; 2014. p. 305-306.
38. Bianchi RC, Campos RC, Xavier-Filho NL, Olifiers N, Gompper ME, Mourão G. Intraespecific, interespecific, and seasonal differences in the diet of three mid-sized carnivores in a large neotropical wetland. *Acta Theriologica* 2013; 59: 13-23.
39. Bianchi RC, Olifiers N, Gompper ME, Mourão G. Niche partitioning among mesocarnivores in a Brazilian Wetland. *PLoS One* 2016; 11: e0162893.
40. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe Publishing; 1994.
41. Hofer E, Reisp K, Revilla-Fernández S, Plicka H, Romanek G, Bago Z, et al. Isolation of *Francisella tularensis* and *Brucella suis* from red foxes (*Vulpes vulpes*). *Tierärztliche Umschau* 2010; 65: 229–232.
42. Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, Le Fleche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, et al. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9: 153–156.
43. Hollett RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology* 2006; 66: 575–587.
44. Carmichael LE, Kenney RM. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 156: 1726-1734.
45. Serikawa T, Muraguchi T. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. *Nihon Juigaku Zasshi* 1979; 41: 607-616.
46. Truong LQ, Kim JT, Yoon BI, Her M, Jung SC, Hahn TW. Epidemiological survey for *Brucella* in wildlife and stray dogs, a cat and rodents captured on farms. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 1597-1601.
47. Baek BK, Park MY, Islam MA, Khatun MM, Lee SI, Boyle SM. The first detection of *Brucella canis* in cattle in the Republic of Korea. *Zoonoses Public Health* 2012; 59: 77-82.

NORMAS DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

Escopo

A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** é um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, multidisciplinar, com acesso aberto (Licença *Creative Commons* - CC-BY - <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que publica pesquisas originais relacionadas a doenças tropicais, medicina preventiva, saúde pública, doenças infecciosas e assuntos relacionados. A preferência para publicação será dada a artigos que relatem pesquisas e observações originais. A Revista possui um sistema de revisão por pares, para a aceitação de artigos, e sua periodicidade é bimestral. A Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é publicada em inglês.

Política de avaliação

Os manuscritos submetidos com vistas à publicação na **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria quanto à adequação às normas. Em seguida, são encaminhados para, no mínimo, dois revisores para avaliação e emissão de parecer fundamentado (revisão por pares), os quais, oportunamente, serão utilizados pelos editores para decidir sobre a aceitação, ou não, do mesmo. Em caso de divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado para um terceiro relator para fundamentar a decisão editorial final, de acordo com o *workflow* do processo de submissão da **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** (disponível online em <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#005>).

O contato com o escritório editorial pode ser estabelecido no endereço abaixo:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Av. Getúlio Gurarritá s/n
Caixa Postal: 118,
CEP: 38001-970
Uberaba, Minas Gerais, Brasil
Tel: 55 34 3318-5287
Fax: 55 34 3318-5279
e-mail: rsbmt@rsbmt.uftm.edu.br
<http://www.scielo.br/rsbmt>

Não há taxa para submissão e avaliação de artigos.

Tipos de manuscrito

A Revista convida à publicação Artigos Originais, Artigos de Revisão e Minirrevisões, Editoriais, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas e Números Especiais.

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo, título e referências). O manuscrito deve conter resumo estruturado com até 250 palavras, com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O Manuscrito deve

ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo Estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito (Introdução, Métodos, Resultados, Discussão), Conflito de Interesses, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e não apenas revisão da literatura, geralmente a convite do editor. Artigos de Revisão têm o limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo com até 250 palavras (não estruturado). Cinco ilustrações são permitidas (tabelas e figuras). São publicadas também minirrevisões. Minirrevisões têm no máximo 3.000 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo (não estruturado) com até 200 palavras, três ilustrações (tabelas e figuras) e máximo de 3.000 palavras. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo não estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito, Conflito de Interesses, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas.

Editoriais: usualmente, escritos a convite, considerando os tópicos da área de enfoque da revista, não excedendo a 1.500 palavras, sem resumo e palavras-chaves e no máximo uma figura ou tabela e dez referências.

Comunicações Breves: devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. As comunicações breves devem ter no máximo 2.000 palavras (excluindo resumo, título e referências); Devem conter resumo estruturado com no máximo 100 palavras (com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) e com até 15 referências. Um máximo de três ilustrações (tabelas e figuras) é permitido. Até três palavras-chaves devem ser fornecidos. O corpo do manuscrito não devem conter subdivisões ou subtópicos. Declaração de conflito de interesses deve ser incluída.

Relatos de Casos: devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras (excluindo título, resumo e referências), com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências, resumo não estruturado com no máximo 100 palavras e três palavras-chaves. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo, Palavras-Chaves, Texto do Manuscrito (Introdução, Relato de Caso, Discussão), Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas.

Relatórios Técnicos: devem ser precisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de *experts*. Será considerado, se formatado como um editorial.

Imagens em Doenças Infecciosas: até três figuras com a melhor qualidade possível. Apenas três autores e três referências são permitidos. O tamanho máximo é de 250 palavras (excluindo título e referências) com ênfase na descrição da figura. Os temas devem envolver alguma lição clínica, contendo título e a descrição das figuras.

Cartas: leitores são encorajados a escrever sobre qualquer tópico relacionado a doenças infecciosas e medicina tropical de acordo com o escopo da Revista. Não devem exceder 1.200 palavras, sem resumo e palavras-chaves, com apenas uma inserção (figura ou tabela) e pode tratar de material anteriormente publicado na revista, com até 12 referências.

Números Especiais: Propostas de números especiais devem ser feitas ao o Editor e/ou Editor Convidado. A proposta será analisada levando em consideração o tema, organização do programa ou produção de acordo com escopo da revista.

Preparação do manuscrito

Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que o processo de revisão e publicação de seu manuscrito seja tão eficiente e rápido quanto possível. Os editores reservam-se o direito de devolver manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções.

Sistema de Sumissão *On-line*: Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão *on-line* nos endereços <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> ou <http://www.scielo.br/rsbmt>. O autor deve escolher dentro do item “Tipos de Manuscrito” uma categoria para o manuscrito: Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas, Réplica à Carta ou Outros (quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores.

Carta de Apresentação: a) deve conter uma declaração, assegurando de que se trata de pesquisa original e que, ainda, não foi publicada, nem está sendo considerada por outro periódico científico. Devem constar, também, que os dados/resultados do manuscrito não são plágio. b) deve ser assinada por todos os autores e, na impossibilidade restrita, o autor principal e o último autor podem assinar pelos outros co-autores, mediante procuração. c) Os autores devem incluir na *Cover Letter* uma declaração de ciência de que o manuscrito, após submetido, não poderá ter a ordem, nem o número de autores alterados, sem justificativa e/ou informação à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. d) Devem declarar que concordam, caso o manuscrito seja aceito para publicação, transferir todos os direitos autorais para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Contribuição dos autores: Os autores devem incluir, em documento separado, uma declaração de responsabilidade especificando a contribuição, de cada um, no estudo.

Edição da Pré-Submissão: todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser em inglês. É altamente recomendável que os autores utilizem os serviços de uma empresa profissional de edição e/ou tradução. A revisão/edição da língua inglesa não garante que o manuscrito será aceito para publicação.

Formatação do manuscrito

O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte *Times New Roman* tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelos menos 3cm. O manuscrito

deve ser dividido nas seguintes seções: Cartão de Apresentação (endereçada ao Editor-Chefe), Página de Título, Título, Resumo, palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Declaração de Conflito de Interesses, Lista de Referências, Título das Figuras/Legendas. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados (estes dois últimos podem ser incluídos junto com a Página de Título). Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, afiliações institucionais (Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País de cada autor). O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone, fax e e-mail. Na página de título também podem ser incluídos agradecimentos e suporte financeiro. A quantidade de autores por manuscrito é limitada a oito, exceto para estudos multicêntricos.

Indicação de potenciais revisores: Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de região e instituição diferente dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 50 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 palavras devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas e o número de aprovação deve ser enviado à Revista.

Ensaio Clínico: No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC). Estes requisitos estão de acordo com a BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>) e do Workshop ICTPR.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos àqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, em ordem numérica crescente, separadas por parênteses, sem vírgula. [Ex.: Mundo^{(1) (2) (3)}; Vida^{(30) (42) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50)}]. As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus* (Consulte: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=limits>).

Alguns exemplos de referências:

1. Citação de Artigos em Geral: autores, título do artigo na língua original em que foi publicado, nome do periódico, ano, volume, páginas inicial e final completas. Russell FD, Coppell AL, Davenport AP. *In vitro* enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:697-701.

2. Capítulo de livro: autores do capítulo, título do capítulo, editores, nome do Livro, edição, cidade, editora, ano e página. Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. *In:* Katzung BG, editor. Basic and clinical pharmacology. 6th ed. Norwalk (CN): Appleton and Lange; 1995. p. 361-380.

3. Livro: autores do livro, nome do livro, edição, cidade, editora e ano. Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

4. Dissertação/Tese: Autor, Título, Tipo (Dissertação ou Tese), Lugar da Publicação, Nome da Instituição, Ano, Total de páginas. Cosendey MAE. Análise da implantação do programa farmácia básica: um estudo multicêntrico

em cinco estados do Brasil. [Doctor's Thesis]. [Rio de Janeiro]: Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz; 2000. 358 p.

Figuras: devem ser submetidas, em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (exemplo: Figura 1; Figura 2). Todas as figuras devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. **Título e Legendas:** devem ser digitadas com espaçamento duplo no final do manuscrito. **Dimensões:** As dimensões das figuras não devem ultrapassar o limite de 18cm de largura por 23cm de altura. Veja abaixo a correta configuração para cada formato de figura:

- **Fotografias:** devem ser obrigatoriamente submetidas em alta resolução no formato *Tiff*. Certifique-se que a mesma foi capturada na resolução mínima de 600 DPI, preferencialmente entre 900-1200dpi, preparadas utilizando programa de Editoração de Imagens (*Adobe Photoshop, Corel Photo Paint, etc*).
- **Gráficos:** criados usando *Microsoft Excel*, devem ser salvos com a extensão original (.xls).
- **Mapas e Ilustrações:** devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os softwares *Corel Draw* ou *Illustrator* em alta resolução.
- **Imagens:** produzidas em software estatístico devem ser convertidas para o formato *Excel* ou se o programa permitir, em formato PDF.

Ilustrações Coloridas: devem ser aprovadas pelos editores e as despesas extras para confecção de fotolitos coloridos serão de responsabilidade dos autores.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento simples, com título curto e descritivo (acima da tabela) e submetidas em arquivos separados. Legendas para cada tabela devem aparecer no rodapé da mesma página que a tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo. Tabelas devem ter no máximo 18cm de largura por 23cm de altura, fonte *Times New Roman*, tamanho 9.

Processo de Envio: os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>, seguindo as instruções no topo de cada tela. O processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

Sobre Reenvio e Revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão re-avaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

Reenvio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá re-enviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito.

Revisão: caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

Após a Aceitação: Uma vez aceito para publicação, o processo de publicação inclui os passos abaixo:

- a) Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, deve retornar para a revista assinado pelos autores.
- b) Provas: serão enviadas ao autor responsável, mencionado no endereço para correspondência, no formato PDF, para que o texto seja cuidadosamente conferido. Nesta etapa do processo de edição, não serão permitidas mudanças na estrutura do manuscrito. Após os autores receberem as provas, deverão devolvê-las corrigidas, dentro de dois a quatro dias.
- c) Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo ao cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.
- d) Os artigos aceitos remanescentes a cada número da revista serão disponibilizados *online* enquanto aguardam a prioridade para publicação na versão impressa.

Re-impressões: a Revista fornece ao autor, gratuitamente, excertos do artigo em formato PDF, via e-mail.

Custos de Publicação: Não haverá custos de publicação.

A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução são de responsabilidade dos autores. A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** não fornece qualquer tipo de serviço de tradução. Custos de publicação de imagens coloridas são de responsabilidade dos autores.