

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOTECNOLOGIA

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *BRUCELLA* EM
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE INDIVÍDUOS COM DOENÇAS ARTICULARES
NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS
DA BRUCELOSE NO BRASIL**

CAMPO GRANDE – MS FEVEREIRO, 2019

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
STRICTO SENSU EM BIOTECNOLOGIA

Autora: Jucélia dos Santos Silva

Orientadora: Prof.Dra. Carina Elisei de Oliveira

Coorientador: Dr. Felipe Bisaggio Pereira

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *BRUCELLA* EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS DE INDIVÍDUOS COM DOENÇAS ARTICULARES NO ESTADO DE
MATO GROSSO DO SUL E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA BRUCELOSE NO
BRASIL**

**Dissertação apresentada, como parte das exigências
para obtenção do título de MESTRE EM
BIOTECNOLOGIA no Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Biotecnologia da Universidade Católica
Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia**

**Campo Grande
Feveriro de 2019**

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

S586d Silva, Jucélia dos Santos

Detecção molecular e sorológica de brucella em amostras biológicas de indivíduos com doenças articulares no estado de Mato Grosso do Sul e aspectos epidemiológicos da brucelose no Brasil / Jucélia dos Santos Silva; orientadora Carina Elisei de Oliveira; coorientador Felipe Bisaggio Pereira.-- 2019.

70 f.: il.; 30 cm

Dissertação (mestrado em biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2019
Inclui bibliografia

1. Brucelose. 2. Diagnóstico molecular. 3. Saúde pública.
4. Doenças articulares. I.Oliveira, Carina Elisei
de. II.Pereira, Felipe Bisaggio. III. Título.

CDD: 616.957

Ativar o Windows
Acesse Configurações p...

Detecção Molecular e Sorológica de *Brucella* em Amostras Biológicas de Indivíduos com Doenças Articulares no Estado de Mato Grosso do Sul e Aspectos Epidemiológicos da Brucelose no Brasil

Autora: Jucelia dos Santos Silva

Orientadora: Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Bisaggio Pereira

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

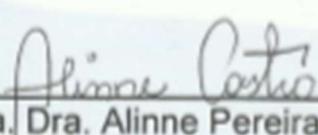
APROVADA em 14 de março de 2019.



Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira- UCDB



Prof. Dr. Felipe Bisaggio Pereira - UFMS



Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro – UCDB



Prof. Dr. Fernando Aguilar Lopes- UFMS

EPÍGRAFE

Todo guerreiro já ficou com medo de entrar em combate.

Todo guerreiro já perdeu a fé no futuro.

Todo guerreiro já trilhou um caminho que não era dele.

Todo guerreiro já sofreu por bobagens.

Todo guerreiro já achou que não era guerreiro.

Todo guerreiro já falhou em suas obrigações.

Todo guerreiro já disse "SIM" quando queria dizer "NÃO".

Todo guerreiro já feriu alguém que amava.

Por isso é um guerreiro; porque passou por estes desafios, e não perdeu a esperança de ser melhor

do que era. (Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar capacidade de aprendizado e uma inquietude constante em busca do saber.

Agradeço as pessoas que cruzaram meu caminho e mudaram minha caminhada, sobretudo, os ensinamentos, dedicação, persistência e humildade proporcionados pelo Dr. Felipe Bisaggio Pereira e pela professora Dra. Carina Elisei de Oliveira pela oportunidade, ensinamento e paciência.

Agradecimento especial as professoras doutoras da Universidade Católica Dom Bosco, Daniele Decanine e Luana Soares, pela colaboração e dedicação inicial ao projeto de mestrado.

Agradeço meus familiares que assistiram minha luta e vivenciaram todas as etapas, desse processo, sempre com uma palavra amiga, com um leve empurrão, sobretudo, pela minha mãe Conceição, que usa de toda inocência, experiência e fé em Deus para me dizer que acredita em mim e que sou até mais do que ela sonhou. Bem como a todos os meus irmãos, que acreditam em mim e se orgulham em ver que seguimos tentando, lutando, em especial ao meu irmão Assis dos Santos Silva.

Agradeço em especial também a minha amiga Anna Alice Vidal Bravalhieri, pela companhia em sete anos de amizade pura, profissionalismo e torcida incondicional uma pela outra e por aguentar minhas crises de desânimo e chatices.

Agradeço muito a uma galera companheira de mestrado: Luccas Pires, Letícia Zulczewski, Robéria Mandú, pelo carinho e companhia nas aflições.

E ainda a todos os pacientes envolvidos na pesquisa, que através deles pude realizar a pesquisa em questão e subir mais um degrau rumo ao meu sonho de realização profissional.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Espécies de *Brucella* obtidas na base de dados GenBank utilizadas na análise de similaridade, associadas aos respectivos números de acesso.

Tabela 2: Listagem das amostras, avaliadas no presente estudo relacionadas às respectivas informações acerca dos fatores de risco, avaliação clínica e patologia, e resultados dos ensaios ATT e PCR.

Capítulo 2

Tabela 1: Prevalência de brucelose de acordo com o sexo, área de habitação e atividade laboral, no Brasil, dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017, associadas aos coeficientes dos respectivos testes estatísticos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alinhamento dos nucleotídeos e respectivos resíduos de aminoácidos (iniciando no *frame* 2) referentes a proteína BSP 31 das sequencias de *Brucella* spp., geradas no presente estudo e obtidas na base de dados do GenBank (associadas aos respectivos números de acesso). Estão discriminados apenas o consenso e os respectivos polimorfismos. As quatro primeiras sequencias (*Brucella_G1*, *Brucella_G2*, *B. abortus* e *B.canis*) foram obtidas no presente estudo.

Figura 2. Matriz de similaridade genética entre as sequências do gene *bcsp* 31 de *Brucella* spp., obtidas no presente estudo e da base de dados do GenBank, utilizadas no alinhamento genético. As 4 primeiras sequencias (*Brucella_G1*, *Brucella_G2*, *Brucella_abortus* e *B_canis*) foram obtidas no presente estudo. O gradiente de cores varia da seguinte forma: quanto mais escuro, maior a similaridade genética.

Figura 3. Prevalência de brucelose em humanos por faixas etárias no Brasil, segundo dados do e-SIC de 2013 a 2017. Letras iguais representam valores de prevalência estatisticamente iguais (nível de significância de $p < 0,05$) (0 a 11 anos: criança; 12 a 18: adolescente; 19 a 29: jovem; 31 a 59: adulto, 60 em diante: idoso).

Figura 4. Prevalência da brucelose em humanos de acordo com as regiões do Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017. Letras iguais representam valores de prevalência estatisticamente iguais (nível de significância de $p < 0,05$), asterisco indica valores não considerados nas análises estatísticas devido à baixa amostragem.

Figura 5. Prevalência da brucelose em humanos no Brasil no período de 2013 a 2017, segundo dados do Ministério da Saúde. Letras iguais representam valores de prevalência estatisticamente iguais (nível de significância de $p < 0,05$).

RESUMO

A brucelose é uma doença infectocontagiosa, ocasionada por bactérias, gram-negativas, do gênero *Brucella* responsáveis por ocasionar perdas produtivas nos animais domésticos e seres humanos, além de grande morbidade. Com a execução do presente trabalho, objetivou-se estudar a brucelose humana, sua correlação com doenças articulares, bem como identificar os principais fatores de risco associados a brucelose no Brasil, tendo como base um banco de dados do Ministério da Saúde, via sistema eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC). Para tanto, foram adquiridas 38 amostras de soro e sangue de um banco de amostras biológicas, provenientes de pacientes atendidos no centro de reumatologia em Campo Grande-MS. Essas amostras foram submetidas à técnica sorológica do antígeno tamponado acidificado em placa (PABA) e a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR). Das 38 amostras de soro submetidas ao PABA, 65,78% (25/38) foram positivas, sendo 44,73% (17/38) desses provenientes de indivíduos do sexo feminino e 21,05% (08/38) do masculino. Na PCR 55,26% (21/38) das amostras de sangue testadas foram positivas, sendo que 36,84% (14/38) provieram de indivíduos do sexo feminino e 18,42% (7/38) do masculino. Os produtos de PCR foram clonados, sequenciados, e apresentaram 100% de identidade para o gênero *Brucella*. Em relação aos fatores de risco associados à brucelose, foi possível avaliar que 28,94% (11/38) residem em área rural, e 18,42% (7/38) exercem função em área rural e os dois grupos somados, representaram 47,36% do total (18/38); tais indivíduos apresentaram também convívio com animais. A análise dos fatores de risco à brucelose, realizada com base no banco de dados do Ministério da Saúde (coletados de 2012 a 2017) via sistema eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC) indicaram que, indivíduos que habitam área urbana apresentaram maior prevalência da doença (33,71%) em detrimento dos que vivem em área rural (28,29%) ($p = 0,007$), fato que pode estar relacionado à ocupação laboral em que aqueles que exercem atividade de risco à infecção apresentaram maior prevalência (94,5%) da doença quando comparados com trabalhadores que não exercem atividade de risco (82, 15%) ($p < 0,001$), muitos indivíduos trabalham em áreas rurais exercendo atividade de risco onde se infectam, porém residem nas cidades. Aparentemente a atividade laboral representa o maior fator de risco à infecção por *Brucella*, pois os dados demonstraram também que jovens e adultos são as faixas etárias de maior prevalência de brucelose (35–36% de prevalência vs. 8–26% em crianças, adolescentes e idosos; $p < 0,001$) por ser a época de ativa de trabalho, as regiões do país onde as atividades ligadas à pecuária são mais intensas apresentam maiores índices da doença (Centro Oeste com prevalência de 77,1% vs. 23,5–44,5% nas outras regiões; $p < 0,001$) e o sexo masculino é mais infectados que o sexo feminino (prevalência de 34,81% e 23,86%, respectivamente; $p < 0,001$) devido ao fato que maioria dos trabalhadores nesses setores são do sexo masculino. Com a realização desse trabalho foi possível constatar a presença de anticorpos e DNA de *Brucella* nas amostras biológicas estudadas e com as análises dos dados e-SIC, que há necessidade de maiores estudos sobre a epidemiologia e os impactos da prevalência da brucelose humana no Brasil, principalmente porque a doença causa grande impacto na qualidade de vida do indivíduo e, atualmente muitas informações são lacunares, sobretudo o acesso da população às mesmas.

PALAVRAS-CHAVE: Saúde Pública, Diagnóstico Molecular, Doenças Articulares.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease caused by gram-negative bacteria from the genus *Brucella*, which are responsible for causing productive losses in domestic animals and great morbidity in humans. The aim of the present study was to study human brucellosis, its relations with joint diseases, as well as identify the main risk factors associated with brucellosis prevalence based on a dataset of the 'Ministério da Saúde do Brasil', obtained from the 'Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC)'. Thirty eight samples of serum and blood were acquired from a biological sample bank of patients attended in the center of rheumatology in Campo Grande. These samples were submitted to the serological essay of the plate buffered acidified antigen (PABA) and the molecular essay of the polymerase chain reaction (PCR). Of the 38 serum samples, 65.78% (25/38) were positive according to the PABA essay, 44.73% (17/38) of which from females and 21.05% (08/38) males. The PCR indicated 55.26% of positivity, of which 36.84% (14/38) from females and 18.42% (7/38) from males. PCR products were cloned and sequenced, showing 100% of identity with the genus *Brucella*. Regarding the risk factors related to brucellosis infection, 28.94% (11/38) of the individuals live in rural areas and 18.42% (7/38) exercises some activity in rural areas, both groups representing 47.36% from the total (18/38); these individuals live together with animals as well. The risk factors linked to brucellosis analysis, performed based on the dataset obtained from the 'Ministério da Saúde' (collected from 2012 to 2017), in the electronic system 'Serviço de Informação ao Cidadão' (e-SIC) indicated that, individuals inhabiting urban areas showed higher prevalences of the disease (33.71%), when compared with those living in rural areas (28.29%) ($p = 0.007$). This fact may be related to job activities of such individuals, because those that exercise some activity representing risk from brucellosis infection showed higher prevalence (94.5%) than those that do not (82.15%) ($p < 0.001$). Much of sampling individuals work in rural areas where, most likely, they acquire the infections, but live in city areas. Suggestively, the job activity represents higher risk to infections by *Brucella*, since data demonstrated that young people and adults have higher prevalences of brucellosis (35–36% of prevalence vs. 8–26% in children, teenagers and aged; $p < 0.001$), which represents the most active labor period in life, the regions where livestock and liked activities are more intense exhibited higher prevalence of the disease (Center-West with prevalence of 77.1% vs. 23.5–44.5% in other regions; $p < 0.001$) and men showed higher infection rates than women (prevalences of 34.81% and 23.86%, respectively; $p < 0.001$), because most of the individuals working on livestock and related activities are men. A temporal analysis regarding the prevalence of brucellosis between 2013 and 2017, regarding the national scenario, suggested fragility and inefficiency on the current system of diagnosis and notification of brucellosis in Brazil. The present work revealed the presence of antibodies and DNA of *Brucella* in the biological samples analysed and, along with database gathered from e-SIC, was possible to conclude that more studies on the epidemiology of human brucellosis in Brazil are needed, mainly because the disease has great impact on individual life quality and, current information are scarce as well as the access to it.

Keywords: Public Health, molecular diagnosis, Joint Diseases.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO GERAL	14
2.1 Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Histórico do agente etiológico causador de brucelose	14
3.2 Características biológicas e morfológicas de <i>Brucella</i>	16
3.3 Características de patogenicidade	17
3.4 Correlação com doenças articulares em seres humanos	18
3.5 Transmissão de brucelose em humanos	18
3.6 Diagnóstico sorológico empregado na detecção de anticorpo anti- <i>Brucella</i> em humanos.	19
3.7 Diagnóstico por PCR	20
3.8 Brucelose e saúde pública.....	21
3.9 Doença ocupacional	Erro! Indicador não definido.
3.10 Situação epidemiológica da brucelose humana no Brasil e implicações em saúde pública.....	Erro! Indicador não definido.
4. REFERÊNCIAS.....	24
5. CAPÍTULO I.....	31
5.1 INTRODUÇÃO:	33
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.2.1 Obtenção e descrição das amostras biológicas	34
5.2.2 Teste de sorologia	35
5.2.3 Extração de DNA	35
5.2.4 Detecção de <i>Brucella</i> por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
5.2.5 Clonagem e sequenciamento.....	36
5.2.6 Alinhamentos e comparações gênicas.....	36
5.3 RESULTADOS.....	38
5.4 DISCUSSÃO.....	48
5.5 REFERÊNCIAS.....	51
6. CAPÍTULO II	54
6.1 Introdução	55
6.2 Materiais e Métodos.....	57
6.3 Resultados e discussão	58

6.3.1 Panorama geral da brucelose humana no Brasil, suas relações com o sexo, área de habitação e atividade laboral dos indivíduos, segundo dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017.....	58
6.3.2 Prevalência de brucelose de acordo com as faixas etárias no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017.....	61
6.3.3 Prevalência de brucelose nas regiões do Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017.....	62
6.3.4 Panorama geral da prevalência de brucelose humana de 2013 a 2017 no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde.....	63
6.4 Conclusão:.....	65
6.5 Referências.....	66
7. Considerações Finais:	Erro! Indicador não definido.
8. Anexo: Anamnese contendo informações clínicas recebidas, junto com as amostras de sangue e soro de cada indivíduo usado nesta pesquisa. (A as amostras 22 e 40 foram excluídas pela falta de correspondência entre soro e sangue).	70

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose infecciosa, que acomete os seres humanos, animais domésticos e silvestres. A incidência anual estimada da doença, em humanos é de aproximadamente 500 mil casos (PAPAS et al., 2006), entretanto, segundo a Organização Mundial da Saúde, este número pode ser cinco ou mais vezes superiores, mesmo nos países desenvolvidos, devido aos subdiagnósticos e as subnotificações (OIE, 2013).

No Brasil, as informações sobre a brucelose humana ainda são escassas, fato que pode estar correlacionado à estrutura de diagnóstico inicial. Contudo, grandes esforços têm sido realizados para implementação de diagnósticos mais efetivos. É importante destacar que a ocorrência da doença varia nas diversas partes do país e em diferentes grupos ocupacionais, uma vez que profissionais que trabalham em contato direto com animais, geralmente bovinos, caprinos e caes têm maior risco de infectar-se com o agente etiológico da brucelose (SANTOS-NETO et al., 1999; SANTOS et al., 2007; RAMOS et al., 2008; TENÓRIO et al., 2008).

As espécies de *Brucella* são transmitidas aos seres humanos principalmente pela manipulação de material de aborto, parto e de carcaças de animais infectados, bem como de fômites contaminados. Dentre outras fontes importantes de infecção ao homem, destacam-se a ingestão de produtos lácteos, normalmente não pasteurizados e contaminados pela bactéria, inalação de aerossóis e em casos excepcionais, a transmissão também pode ocorrer interpessoalmente (sexual e parental) (SZYFRES, 2003).

Os médicos veterinários, criadores e vacinadores estão sujeitos à exposição por material resultante de abortos e secreções de animais infectados, sendo essas as formas mais comuns de infecção para os grupos de risco de acordo com Mahajan (1986). Além disso, infecções accidentais podem ocorrer através de amostras de vacinais (BERKELMAN, 2003). Funcionários de abatedouros também são classificados como grupo de risco, pois trabalham em contato direto com as carcaças. (BRASIL, 2006)

O período de incubação da bactéria está associado ao aparecimento dos sinais e sintomas que podem levar até dois meses na fase aguda, entre dois a 12 meses na fase subaguda e até 12 meses para evolução de um quadro crônico. O quadro clínico da doença varia de acordo com a fase da doença. Na fase aguda, ocorre inicialmente febre contínua, calafrios, sudorese noturna e elevação vespertina da temperatura. Enquanto nas fases, subaguda e crônica os sinais e sintomas podem ser: insônia, impotência sexual, constipação, anorexia, artralgia e dores generalizadas. Quando há quadros com complicações, destacam-se alterações como: encefalite, meningite, orquite, infecção de vesícula seminal e da próstata. O diagnóstico da

doença é feito pelo critério clínico-epidemiológico e pelo critério laboratorial (BRASIL, 2010).

Como a sintomatologia da brucelose pode ser altamente difusa, o método de diagnóstico reconhecido como teste de triagem pela rede do Sistema Único de Saúde (SUS) é o teste sorológico do anfígeno de *Brucella* acidificado em placa (PABA), sendo utilizado como diagnósticos confirmatórios o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) e ou reação em cadeia da polimerase (PCR).

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de anticorpos anti-*Brucella* e DNA em amostras de soro e sangue proveniente de um banco de amostras biológicas pertencentes à indivíduos com doenças ostemusculares, e analisar os dados do Ministério da Saúde relativo às notificações de brucelose em humanos no Brasil.

2.1 Objetivos específicos

- Triar soros contra antígenos de *Brucella abortus* pacientes com doenças ostemusculares pela técnica de ATT;
- Amplificar e sequenciar fragmentos de DNA do gene que codifica a proteína periplasmática imunogênica BCSP31 específica de bactérias do gênero *Brucella*;
- Avaliar fatores de riscos que possam estar associados à brucelose, com base nas informações associadas às amostras biológicas obtidas;
- Identificar e analisar os fatores de risco à brucelose, com base nos dados do Ministério da Saúde (coletados de 2012 a 2017) obtidos via sistema eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico do agente etiológico causador de brucelose

O agente infeccioso *Micrococcus melitensis* foi isolado em 1887, por Sir David Bruce, como causador da febre de malta em soldados britânicos mortos por consequência dessa enfermidade na Ilha de Malta, localizada no mar Mediterrâneo. Em 1895, o patologista veterinário dinamarquês L. F. Bernhard Bang isolou uma bactéria de fetos abortados de bovinos, e denominou de *Bacillus abortus*, identificando assim um dos agentes etiológicos do aborto enzoótico em bovinos (NICOLETTI, 2002; POESTER et al., 2009).

No Brasil, o primeiro registro dessa bactéria foi em 1914, quando o médico Carlos Danton Seixas diagnosticou a febre de Malta no estado do Rio Grande do Sul no Ceará, três anos depois, Thomaz Pompeu Sobrinho observou abortamento constante, porém não epidêmico, em ovinos, equinos e bovinos (SELEGATO, 2013).

Historicamente, a classificação taxonômica das espécies do gênero *Brucella* foi estabelecido em 1920 por Meyer and Shaw, baseado na relação da preferência por espécies hospedeiras e características bioquímicas e fenotípicas, baseado na existência de características como: exigência de CO₂, produção de H₂S, sensibilidade ao corante, lise por bacteriófago específico de *Brucella* e aglutinação com soros monoespécíficos (CORBEL et al., 1975).

Entretanto, apesar da fenotipagem ainda ser amplamente utilizada, em laboratórios de referência, suas limitações são cada vez mais reconhecidas, e o surgimento de novas espécies está erodindo ainda mais o seu valor. Descrições recentes se basearam em dados adicionais de abordagens moleculares, e um processo de atualização dos padrões para descrever novas espécies de o gênero *Brucella*, tem sido refletido, essa abordagem está em andamento no atual Subcomitê do ICSP sobre Taxonomia de *Brucella* (WHATMORE et al., 2014).

O gênero *Brucella* compreende atualmente 12 espécies, *B. melitensis* (caprinos e ovinos) *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. canis* (canídeos), *B. ovis* (ovinos), *B. neotomae* (rato-do-deserto); *B. microti* (camundongo-do-campo), *B. ceti* (golfinhos e baleias); *B. pinnipedialis* (focas), *B. inopinata* (humano) e *B. papionis* (babuínos) *B. vulpis* (raposa) (WHATMORE, 2009; CARVALHO et al., 2010; WHATMORE et al., 2014; SCHOLZ et al., 2013). Vale destacar que as seis primeiras espécies listadas compreendem as espécies denominadas de clássicas e as seis espécies restantes foram descritas na última década, após um longo período de estabilidade na taxonomia do gênero *Brucella* e refletem uma contínua compreensão de hospedeiros de *Brucella* (GODFROID et al., 2011).

Devido à alta relação do material genético (DNA-DNA) entre as seis espécies denominadas de clássicas foi sugerido que o gênero deveria ser monoespécífico e consistir em somente uma espécie *B. melitensis*, com seis biovarias, Melitensis, Abortus, Suis, Ovis, Neotomae e Canis (VERGER et al., 1985). Contudo, em 2003, o Subcomitê do ICSP sobre Taxonomia de *Brucella* concordou por unanimidade o retorno da taxonomia com as seis espécies e mais os biovarias de *B. suis*, *B. abortus* e *B. melitensis* (OSTERMAN & MORIYÓN, 2006).

As espécies descritas recentemente *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, e *B. vulpis* atendem ao padrão existente de alta homogeneidade genética, e de compartilhando de

sequências do gene 16S rRNA idênticas (WALTMORE, et al. 2014; SCHOLZ et al., 2010). No entanto, as espécies de *B. inopinata* e *B. papionis*, mostram algumas diferenças de 2-3 nucleotídeos, embora essas espécies estejam muito mais próximas de *Brucella* do que ao gênero vizinho *Ochrobactrum* (DE et al., 2008).

3.2 Características biológicas e morfológicas de *Brucella*

As bactérias causadoras de brucelose são gram-negativas, intracelulares facultativas, imóveis, não esporuladas, que se apresentam em cultivo primário como colônias lisas ou rugosas. Essas bactérias possuem como temperatura ótima de multiplicação a faixa entre 20 a 40°C, com temperatura ideal em torno de 37°C, e o pH ótimo de crescimento varia de 6,6 a 7,4 (PAJUABA, 2006; OIE, 2009; SOLA et al., 2014).

As bactérias do gênero *Brucella* têm capacidade de sobreviver no meio ambiente em condições naturais diversas, sendo sua resistência diminuída em locais com baixa umidade, ausência de luz ou aumento da temperatura (SELEGATO, 2013).

A morfologia das colônias bacterianas está diretamente associada à composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular, que está relacionada ao fator de virulência e ativação da resposta imunológica (CARDOSO et al., 2006). As colônias lisas possuem lipídeo, núcleo oligossacarídeo e cadeia O, enquanto as colônias rugosas apresentam a cadeia O incompleta. (SANTOS, 2011). Vale destacar que *B. abortus* e aos sete biovaras (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9) que normalmente apresentam morfologia lisa, ao sofrerem mutações para formas rugosas ou mucoides, perdem sua patogenicidade (ALTON et al., 1988; PAJUABA, 2006; OIE, 2009; SOLA et al., 2014)

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* possuem características peculiares de resistência ao hospedeiro, gerando infecções crônicas e persistentes, sendo essas habilidades determinadas pelos fatores de virulência apresentados por estes microorganismos. O sistema de secreção do tipo IV (T4SS) é um dos capazes de exportar moléculas relacionadas à virulência através da membrana da bactéria gram-negativa (BASTOS et al., 2012).

O T4SS é um mecanismo de vários componentes codificado pelo operon virB, responsável pela inserção das proteínas na célula hospedeira. Em *Brucella* este sistema é composto por 12 genes que codificam proteínas denominadas de VIRB1 até VIRB12 e VIRD4 (HASHEMIFAR et al., 2017). Cabe destacar que o sistema VIRB é essencial para a sobrevivência de bactérias, do gênero *Agrobacterium*, *Bartonella*, *Legionella*, *Anaplasma* e *Brucella*.

As proteínas denominadas VIRB1 e VIRB5 desempenham papel crítico, se ligando aos receptores de superfície celular, resultando na translocação dos efetores na célula hospedeira (YEO et al., 2003; BASTOS et al., 2012; HASHEMIFAR et al., 2017). As VIRB9 de várias espécies de organismos são proteínas homólogas com 300 resíduos apresentando nível moderado de sequências peptídicas conservadas e, juntamente com as VIRB7, formam uma estrutura responsável pela estabilização das outras VIRB, formando canais que conectam as membranas externa e interna (YEO; WAKSMAN, 2004; ELISEI et al., 2009).

Conforme apresentado por Elisei et al. (2009), ainda existem muitas questões acerca do funcionamento completo do sistema IV de transporte VIRB e suas implicações na virulência de *Brucella*, como por exemplo, em relação às moléculas efetoras secretadas por este sistema que ainda não foram identificadas. Outra importante contribuição seria o estudo das proteínas deste sistema de transporte de maneira a apresentar características potenciais de imunoproteção, que possam ser utilizadas como vacinas recombinantes.

3.3 Características de patogenicidade

De acordo com Sola et al. (2014), estas bactérias têm como órgãos de predileção aqueles que oferecem elementos necessários para o seu metabolismo, como o eritritol presente no útero gravídico, tecidos mamários, osteoarticulares e órgãos do sistema reprodutor masculino.

O eritritol presente no útero gravídico de animais ungulados tem as concentrações aumentam gradativamente conforme o período gestacional, atingindo níveis máximos nos períodos próximos ao parto, ocasionando abortos no terço final da gestação (LAGE et al., 2008; SOLA et al., 2014). Pellegrin et al. (2006) apontam a ocorrência de um processo denominado placentite necrótica, causada pela infecção dos placentomas, que, diminuindo a passagem de nutrientes e oxigênio, leva à morte fetal. Porém, sabe-se que há o desenvolvimento de imunidade celular animal após o primeiro aborto, reduzindo as chances de perda da cria nas futuras gestações, porém apresentam outros sintomas, tais como retenção de placenta, natimortalidade ou o nascimento de bezerros fracos, infertilidade ou esterilidade (LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; SOLA et al., 2014).

No caso dos animais domésticos machos, *Brucella* spp. se instalaram principalmente nos órgãos acessórios do sistema reprodutor como a vesícula seminal, podendo ser eliminada pelo sêmen (JUNIOR et al., 2012).

O tempo de incubação definido como o tempo entre a exposição à bactéria e o aparecimento de sintomas, varia de semanas até meses ou anos (SELEGATO, 2013).

3.4 Correlação com doenças articulares em seres humanos

Nos seres humanos a sintomatologia da brucelose é muitas vezes inespecífica, portanto é importante obter um histórico detalhado, que inclua a ocupação, o contato com animais, viagens a áreas endêmicas e a ingestão de alimentos de risco, bem como ter em mente que qualquer órgão ou tecido do corpo pode ser virtualmente acometido pela bactéria causadora da doença (LAWINSKY et al., 2010).

O envolvimento de ossos e articulações é bastante frequente na brucelose, ocorrendo em aproximadamente 40% dos casos. A sacrolite causada por *Brucella* é muito comum, geralmente os indivíduos também apresentam febre e dor nas costas, que frequentemente irradiam para as pernas. (Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância em Saúde para Brucelose Humana no estado do Paraná, 2015).

Além disso, ainda que algumas queixas álgicas importantes devem ser destacadas como sendo as principais, artralgias de pequenas e grandes articulações, mialgias e cefaléias, outros sintomas também são observados como anorexia, astenia, obstipação, náuseas, vômitos, tosse seca, alterações comportamentais, humor depressivo e alterações do sono.

Crianças podem se recusar a andar e apoiam o peso do corpo em uma das pernas. Ainda na fase aguda, radiografias e cintilografias podem se mostrar normais, mas com o passar do tempo, uma tomografia computadorizada ou ressonância magnética podem demonstrar estreitamento no espaço entre os discos intervertebrais (CORBEL, 2006) afirma que a osteomielite vertebral é visivelmente aparente quando os exames mostram a destruição dos corpos vertebrais, sendo que as vértebras lombares são mais acometidas do que as torácicas e cervicais; já abcessos para vertebrais são menos comuns na brucelose.

3.5 Transmissão de *Brucella sp.* para humanos

A transmissão para humanos ocorre por contato direto ou indireto com animais infectados, anexos fetais ou abortos, bem como através da ingestão de produtos de origem animal contaminados, e manipulação de carcaças e vísceras durante abates sanitários (SOLA et al., 2014).

A infecção natural se inicia através das mucosas oral, nasofaríngea e conjuntival, porém a principal porta de entrada de *B. abortus* é a mucosa orofaringeana (RIBEIRO et al., 2008). Após penetrar na mucosa, as bactérias são fagocitadas, carreadas até os linfonodos e nestes se multiplicam. Os microorganismos podem se disseminar livremente ou no interior de

macrófagos, pelas vias hepática e linfática tendo como principal destino órgãos como baço e fígado, ou outros linfonodos espalhados pelo corpo (LAGE et al., 2008; SOLA et al., 2014).

3.6 Diagnóstico sorológico empregado na detecção de anticorpo anti-*Brucella* em humanos.

O diagnóstico da brucelose é realizado pelo critério clínico-epidemiológico e pelo critério laboratorial. O método laboratorial utilizado na rede do Sistema Único de Saúde (SUS) é o teste sorológico por reação de aglutinação rápida com antígenos de *Brucella abortus*, conhecido como rosa de Bengala e ou antígeno de *Brucella* acidificado em placa (PABA) (BRASIL, 2005).

Quando se trata de diagnóstico sorológico o antígeno acidificado tamponado (AAT) é preconizado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose animal (PNCEBT), e pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) como teste padrão para triagem de *B. abortus*, no Brasil. Sendo esse teste preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o corante rosa de Bengala. Essa prova é qualitativa, pois não indica o título de anticorpos no soro testado. Essa leitura revela a presença ou a ausência de IgG1. Entretanto, nas provas clássicas de aglutinação, reagem tanto anticorpos IgM como IgG total, enquanto que, nessa prova reagem somente os isótipos da classe IgG1, pois o pH acidificado inibe a aglutinação dos anticorpos inespecíficos IgG2 e IgM.(POESTER, 2013; CHOTHE; SAXENA, 2014).

Outra técnica importante é o teste ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) (indireto e competitivo) que permite o processamento de um grande número de amostras simultaneamente e, quando há hemólise na amostra, não afeta a viabilidade do soro (NOZAKI, 2004). O teste baseia-se em reações antígeno anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas (teste imunoenzimático). A enzima mais comumente usada nesta prova é a peroxidase, responsável por catalisar a reação de desdobramento da água oxigenada (H_2O_2) em H_2O mais O_2 .

No I-ELISA (indireto) empregado na detecção do anticorpo contra *Brucella* em bovino utiliza-se como antígeno o LPS de *B. abortus* e como conjugado utiliza-se anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovino conjugado a peroxidase, podendo conter adjuvantes quelantes como EDTA/EGTA para minimizar reações inespecíficas. O teste é de alta sensibilidade e especificidade semelhante a do AAT (CHOTHE; SAXENA, 2014). No teste de C-Elisa (competitivo), também é utilizado como antígeno imobilizado na fase sólida o LPS de *B. abortus*.

O soro é misturado com anticorpo monoclonal específico contra a cadeia “O” de *B. abortus*. Para detectar o anticorpo monoclonal ligado ao antígeno imobilizado na fase sólida do teste, utiliza-se um conjugado de peroxidase-anti-IgG. Quanto maior a quantidade anti-cadeia “O” de *Brucella* spp. no soro testado, maior será a competição com o anticorpo monoclonal. O teste é muito sensível e específico e recomendado pela OIE como teste confirmatório para o diagnóstico, assim como a fixação de complemento (FC) (BRASIL, 2006; CHOTHE; SAXENA, 2014).

3.7 Diagnóstico por PCR

Diversos ensaios de PCR têm sido desenvolvidos para diferenciação das espécies e biovaras de *Brucella*, baseado no tamanho dos fragmentos amplificados (BRICKER; HALLING, 1994), associados às análises do polimorfismo dos fragmentos por enzimas de restrição (RFLP) (DA COSTA et al, 1996).

As regiões alvo utilizadas codificam proteínas externas de membrana (omp 2b, omp2a, omp31 e bcsp 31) (BAILY et al., 1992; GUARINO et al., 2000), 16S rRNA (HERMAN; RIDDER, 1992), região inter-gênica ITS aos genes 16S e 23S (DA COSTA, et al, 1996), gene ligado ao metabolismo do eritritol (BRICKER; HALLING, 1994) e sequências de interseções IS711 (IS313/IS639), (BRICKER; HALLING, 1994; REDKAR et al., 2001).

Outro alvo utilizado para detecção de bactérias do gênero *Brucella* é o elemento de inserção múltipla IS711, que se baseia nas repetições *in tandem* no elemento de inserção 711 (IS711), que é uma região exclusiva de *Brucella* spp., a qual pode variar em número de cópias de acordo com as diferentes espécies e biovaras (BRICKER; HALLING, 1994; VEMULAPALLI et al., 1999.; MORENO, 2002).

As técnicas moleculares, como a de PCR, têm sido empregadas para detecção de vários agentes infecciosos, contudo ainda não foram preconizadas pelo Ministério da Saúde para diagnosticar os agentes etiológicos da brucelose. Os primeiros ensaios utilizando a PCR para diagnóstico de brucelose no Brasil utilizaram oligonucleotídeos gênero-específico, capazes de identificar as bactérias a nível genérico. Um dos pares de oligonucleotídeos utilizados é B4/B5, que amplifica um fragmento de aproximadamente 223 pb. Sabe-se que este fragmento corresponde ao gene que codifica uma proteína periplasmática imunogênica (BCSP31) específica de bactérias do gênero *Brucella*. Esses marcadores genéticos vêm sendo empregados por outros autores com o objetivo de detectar *Brucella* spp. em uma extensa gama de substratos de origem biológica, como vísceras, leite e sangue, devido à sua alta especificidade e sensibilidade (BAILY et al., 1992).

3.8 Doença ocupacional

Por se tratar de uma doença ocupacional, a brucelose ocupa lugar importante neste quesito, pois afeta geralmente grupos profissionais da área de pecuária, ou os que lidam com animais, principalmente os de produção leiteira. Porém, sabe-se que pode acometer, ainda, os funcionários que participam diretamente do abate de animais e que estão expostos ao sangue, carcaças e vísceras (CARDOSO et al., 2011).

Os médicos veterinários estão sujeitos aos mesmos riscos, durante exercício das atividades de assistência às criações ou inspeção sanitária de produtos de origem animal nos abatedouros (GERMANO et al., 2003). Esta enfermidade faz parte da lista de doenças infecciosas e parasitárias relacionadas ao trabalho, sendo classificada no Grupo I do Código Internacional de Doenças - CID 10 e mesmo em locais considerados livres de brucelose animal, podem ocorrer casos importados devido à circulação de pessoas de áreas endêmicas para as livres (BRASIL, 1999).

Algumas áreas chegam a apresentar prevalência de dez casos por 100.000 habitantes e, embora seja raramente fatal nos seres humanos (letalidade de 0,1%), compromete o desempenho profissional, podendo manifestar quadros clínicos severos em que as sequelas podem diminuir a qualidade de vida do indivíduo, sendo o tratamento bastante longo (DIVE, 2012).

3.9 Situação epidemiológica da brucelose humana no mundo e Brasil e as implicações em saúde pública

Sobre a distribuição mundial da doença, Pessegueiro e Correia (2003) relatam que a doença ocorre com maior incidência na bacia do Mediterrâneo, na península arábica, no subcontinente indiano, partes do México, da América Central e do Sul. E que ainda existe alta incidência na região norte da África e no Oriente Médio, com uma média de 67,76 pessoas infectadas a cada 100.000 pessoas. Na região da África subsaariana a incidência é de 34,86/100.000 pessoas, na Europa Ocidental 6,56/100.000 pessoas, na Ásia Central 88,00/100.000 pessoas, na América Central e América Latina 19,26/100.000 pessoas e nos Estados Unidos da América é de 0,055/100.000 pessoas, (SCHMITT et al., 2017; PESSEGUEIRO; CORREIA, 2003).

Schmitt et al. (2017) e Pessegueiro e Correia (2003) relatam que o México se apresenta como um grande potencial transmissor do agente causador da brucelose para os estados localizados no sul dos EUA, devido as fronteiras entre esses países.

Foi realizada na China, nos anos 2004 e 2010, uma avaliação epidemiológica que evidenciou, através de um sistema de notificação de doenças, um registro de 162.329 casos de brucelose humana em 1.201 de 2.922 municípios analisados, respectivamente, observando-se um pico de casos na primavera e verão, predominantemente em indivíduos do sexo masculino. Na China, a brucelose é de notificação compulsória, tanto em humanos como em animais (MCDONALD et al., 2006).

No Brasil, existem diagnósticos que tratam sobre a situação da brucelose bovina nacional, sendo estimada a porcentagem de animais soropositivos em 4% na região Sul, 7,5% na região Sudeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 2,5% na região Nordeste e 4,1% na região Norte, sendo esses dados refletidos na saúde humana (BRASIL, 2006).

Ciente de que a brucelose em humanos tem como principal fonte de infecção os animais, os dados apresentados anteriormente, se tornam muito relevantes para discussão, pois a brucelose está representada entre as zoonoses infecciosas, como um risco de saúde pública de caráter persistente, difícil tratamento, controle e erradicação (NOCITI et al., 2008).

É importante ressaltar que, no Brasil não existem dados epidemiológicos sobre a brucelose humana, mesmo este sendo um país que abriga a maior população comercial de bovinos do mundo. Este é um fator de risco evidente para o aumento da prevalência da doença em humanos causada principalmente por *B. abortus*.

Segundo Mendes et al (2005), a prevalência real da brucelose é ainda amplamente desconhecida no Brasil, e são poucos os laboratórios da rede pública que disponibilizam os meios diagnósticos, fato que é agravado pela não obrigatoriedade de notificação da doença.

A brucelose é uma das zoonoses mais importantes do mundo, ao lado da tuberculose bovina e raiva (ROTH et al., 2003). Sendo que o isolamento de *Brucella* nos seres humanos reflete a sua presença na população animal (LUCERO et al., 2006). A doença tem um impacto importante no mundo inteiro sobre a saúde humana e na indústria animal. Na maioria dos países, a brucelose é uma doença de notificação obrigatória ao contrário do que ocorre no Brasil (PAHO, 2000). Além disso, é uma doença de pouca visibilidade pela complexidade do diagnóstico, por isso pouco se sabe sobre a sua real situação no país (CARDOSO; COSTA, 2011).

Algumas pesquisas relevantes sobre brucelose humana foram realizadas no Brasil ainda na década de 90, em que foi feita uma investigação sorológica da doença em trabalhadores de frigorífico que estavam em contato direto com animais, numa área de abate em Salvador, BA. Nessa ocasião, foram examinadas amostras sorológicas de 85 pessoas com positividade de 66,4%, e realizado questionário epidemiológico, em que nenhum dos trabalhadores apresentava sinais clínicos da enfermidade (MAURELIO et al., 2016). Isso leva a entender

que mesmo não havendo manifestação clínica evidente, indivíduos podem estar acometidos com a doença e sujeitos a adquirirem doenças correlacionadas.

Em outro momento realizou-se uma busca epidemiológico na região Norte do Paraná, através de questionário e realização de exames sorológicos em 150 trabalhadores de um frigorífico, buscando determinar a prevalência de brucelose e identificar o risco ocupacional. Os resultados demonstraram prevalência total de 0,66%, não sendo considerada enfermidade predominantemente ocupacional na região em questão (GONÇALVES et al., 2006).

No estado do Paraná na cidade de Jataizinho, foi realizado um levantamento sorológico de brucelose avaliando-se desta vez, 63 propriedades rurais. Foram colhidas amostras de soro de 270 pessoas, das quais 25 (12,1%) mostraram-se positivas aos testes sorológicos (GONÇALVES et al., 2013).

Em maio de 2012, no estado de Minas Gerais, em um laboratório foi detectado um surto de brucelose entre seus funcionários após falhas mecânicas em importantes equipamentos de segurança laboratoriais (na capela de fluxo laminar e na capela de segurança). Neste caso, 11 indivíduos foram expostos, três deles apresentaram soroconversão e manifestações clínicas (RODRIGUES et al., 2013), demonstrando os riscos na manipulação do agente potencialmente patogênico durante execução de atividades profissionais.

Segundo boletim eletrônico emitido pelo Ministério da Saúde e pela Secretaria de Vigilância em Saúde durante o ano de 2008 no Estado do Tocantins, a equipe médica do Hospital de Doenças Tropicais (HDT) recebeu uma notificação de 12 funcionários com sorologia positiva para brucelose. Foi realizada também uma notificação dessa ocorrência à Vigilância Epidemiológica do Município de Araguaína, que dessa forma, notificou o Centro de Informações Estratégica de Respostas de Vigilância em Saúde do Estado do Tocantins, por solicitação da Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins (SES-TO). Com isso, uma equipe de técnicos da Secretaria de Vigilância em Saúde se deslocou ao município para realizar estudos mais elaborados. A base desse estudo se originou a partir de uma clínica apresentada no período de 1º de janeiro de 2006 a 14 de junho de 2008, apresentado dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: febre persistente (>15 dias), cefaléia, mal estar, fraqueza, cansaço, dor e edema testicular, sudorese noturna, esplenomegalia e perda de peso. O caso do paciente suspeito foi confirmado através de sorologia reagente para brucelose. Ao final concluiu-se que eram 28 pacientes entendidos como caso suspeito, sendo 23 efetivamente confirmados por diagnóstico laboratorial sorológico.

No Estado do Tocantins, como já mencionado, essa prevalência em animais segundo o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose variou entre 11

a 38% no ano de 2002, enquanto a prevalência da doença envolvendo grupos ocupacionais de trabalhadores rurais, estudantes de veterinária e médicos veterinários com atuação no campo no município de Araguaína, nos anos de 2005 e 2006 foi de 4%.

O registro da doença é relatado em estudos por amostragem no Brasil, realizados em grupos de animais relacionados à cadeia produtiva como também em grupos populacionais. Fonseca et al. (1999) demonstraram que a prevalência da doença em humanos se encontra relacionada à prevalência da doença que ocorre nos animais.

O trabalho a seguir referente ao Capítulo 1, foi elaborado segundo as normas da revista *Transboundary and Emerging Diseases* e em relação ao Capítulo 2 foi elaborado a partir das normas da Revista *Acta Tropica*.

4. REFERÊNCIAS

ALTON, G. G. et al. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Institute National de la Recherche Agronomique., 1988.

ARAÚJO, F. R. et al. **Avaliação de um Protocolo de Extração de DNA Genômico a Partir de Sangue Total**. Campo Grande. Embrapa Gado de Corte., 2009.

BAILY, G. G. et al. **Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification**. The Journal of Tropical Medicine and Hygiene., 1992.

BASTOS, R. et al. **Avaliação genética das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil**. Vet. Bras., 2012.

BERKELMAN, R. L. **Human illness Associated With Use of Veterinary Vaccines**. Rev Clin Infect Dis., 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Lista de Doenças Relacionadas ao Trabalho**: Portaria nº 1339, de 18 de novembro de 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília: 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. **Investigação de casos de brucelose humana em Araguaína no Estado do Tocantins, Brasil, junho de 2008**. Tocantins: 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília: 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005**: 2011.

BRICKER, B. J; HALLING, S. M. **Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR**. J Clin Micro., 1994.

CARDOSO, P. G. et al. ***Brucella* spp. noncanonical LPS: Structure Biosynthesis, and Interaction With Host Immune System**. Micro Cell Factories., 2006.

CARDOSO, S. C. T; COSTA, L. M. C. **A brucelose no Brasil sob o Enfoque da Saúde Pública**, 2011.

CARVALHO, N. A. V. et al. **Pathogenesis of bovine brucellosis**. J Vet., 2010.

CHOTHE, S. K; SAXENA, H. M. **Innovative Modifications to Rose Bengal plate Test Enhance its Specificity, Sensitivity and Predictive Value in the Diagnosis of Brucellosis**. J of Microbiol Methods., 2014.

CORBEL, M. J. **Brucellosis in Human and Animals**. Geneva: World Health Organization., 2006.

CORBEL, M. J; MORGAN, W. J. BRINLEY. **Proposal for Minimal Standards for Descriptions of New Species and Biotypes of the Genus *Brucella***. International

J of Syst and Evolutionary Microb, 1975.

DA COSTA, M. et al. **Specificity of Six Gene Sequences for The Detection of the Genus *Brucella* by DNA Amplification.** J Applied Bact., 1996.

DE, B. K., et al. **Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection.** J Clin Microbiol., 2008.

ELISEI, C. et al. **Clonagem e Expressão do Gene virB9, Proteína do Sistema de Secreção tipo IV, de *Brucella abortus*.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte., 2009.

FONSECA, L. S. et al. **Prevalência da Brucelose em Diferentes Grupos Populacionais da Cidade de Belém.** Rev Par Med., 1999.

GERMANO. et al. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** São Paulo: Livraria Varela., 2003.

GODFROID, J., et al. **Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century.** Prev Vet Med., 2011.

GONÇALVES, D. D. et al. **Zoonoses in Humans from Small Rural Properties in Jataizinho, Paraná, Brazil.** Braz J Microbiol., 2013.

GONÇALVES, D. D. et al. **Seroepidemiology and Occupational and Environmental Variables for Leptospirosis, brucellosis and Toxoplasmosis in Slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil.** São Paulo: Rev Inst Med Trop., 2006.

GUARINO, A. et al. **Detection of *Brucella* species in Buffalo Whole Blood by Gene-specific PCR.** Rev Vet Record., 2000.

HASHEMIFAR, I. et al. **Molecular prevalence of putative virulence-associated genes in *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates from human and livestock specimens in Iran.** Rev Micro Pathog., 2017.

HERMAN, L; RIDDER, H. **Identification on *Brucella* spp. by Using the Polymerase Chain Reaction.** Rev App Envir Micro., 1992.

JUNIOR, G. N. et al. **Brucelose em Bubalinos: Uma revisão com ênfase ao sorodiagnóstico oficial.** Ver Vet e Zoot., 2012.

LAGE, A. P. et al. **Brucelose bovina: Uma Atualização.** Belo Horizonte: Rev Bras de Repro Animal., 2008.

LAWINSKY, M. L. J. et al. **Estado da Arte da Brucelose em Humanos.** Rev Pan-Amaz Saúde., 2010.

LUCERO, N. et al. ***Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006.** Buenos Aires: Epidemiol Infect., 2007.

MAHAJAN, V. Y. **Innovation Diffusion Models of New Product Acceptance, Ballinger, Cambridge.**,1986.

MATHIAS, L. A. **Brucelose Animal e suas implicações em Saúde Pública.** São Paulo: 2008.

MAURELIO, A. P. V. et al. **Situação epidemiológica Mundial da Brucelose Humana.** Rev Vet. e Zootec., 2016.

MCDONALD, W. L. et al. **Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand.** J Clin Microbiol., 2006.

MENDES, R; JUSSARA, P. M. M. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** Rio de Janeiro: 2005.

MORENO, E. **Brucellosis in Central America.** Rev Vet Micro., 2002.

NICOLETTI, P. **A short history of brucellosis.** Rev Vet Micro., 2002.

NOCITI, R. P. et al. **Fatores de risco associados à brucelose em médicos veterinários com predisposição ocupacional em Mato Grosso, Brasil.** CONBRAVET., 2008.

NOZAKI, C. N; MEGID, K. C; SILVA JUNIOR, F. F; VELOSO, C. S. **Comparação das técnicas de imunodifusão em gel de ágar e ELISA no diagnóstico de brucelose ovina em cabanhas da região Centro-Oeste no estado de São Paulo.** Arquivo do Instituto Biológico. São Paulo: 2004.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** 2009.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Bovine brucellosis. Terrestrial Animal Health Code.** 2013.

OSTERMAN, B. & MORIYO' N, I. **International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the Taxonomy of Brucella: minutes of the meeting.** Int J Syst Evol Microbiol., 2006.

PAHO. **Case Definitions: Anthrax, Brucellosis and Rabies.** Rev Epid Bul., 2000.

PAJUABA, A. C. A. M. **Avaliação de frações hidrofóbicas e hidrofílicas de *Brucella abortus* em ensaios imunoenzimáticos para caracterizar o perfil de anticorpos produzidos por bovinos vacinados e não vacinados.** 2006.

PAPPAS, G. et al. **The New Global map Of Human Brucellosis.** The Lan Infect Diseases., 2006.

PELLEGRIN, A. O. et al. **Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense.** 2006.

PESSEGUEIRO, P. B. C; CORREIA, J. **Brucelose: Uma Revisão Sistematizada.** Rev Med Interna., 2003.

POESTER, F. et al. **Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose:** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009.

POESTER, F. et al. **Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock.** Rev Scient et tech International Office of Epizootics., 2013.

Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância em Saúde para a Brucelose Humana no Estado do Paraná. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná., 2015.

REDKAR, R. et al. **Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*.** Mo Cell Probel., 2001.

RIBEIRO, M. G; MOTTA, R. G; ALMEIDA, C. A. S. **Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil.** Rev Bras Repro Animal., 2008.

RODRIGUES, A. L. C. et al. **Outbreak of laboratory-acquired *Brucella abortus* in Brazil: a Case Report.** Rev Soc Bras Med Trop., 2013.

ROTH, F. et al. **Human Health Benefits from Livestock Vaccination for Brucellosis: Case Study.** Bulletin of the World Health Organization., 2003.

SANTOS, F. A. A. **Caracterização de peptídeos recombinantes associados à brucelose bovina e suas aplicações diagnósticas e vacinais.** 2011.

SCHMITT, K; MARTINS, C. I; CERESER, F. D. **Brucelose: Uma questão de Saúde Pública:** Revista electrónica de Veterinária, 2017. Disponivel em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090917/091713.pdf>> . Acesso em: 20.d Dez. 2018.

SCHOLZ, H. C.; VERGNAUD, G. **Molecular characterisation of *Brucella* species.** Rev Sci Tech., 2013.

SCHOLZ, H. C. et al. ***Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection.** Int J Syst Evol Microbiol., 2010.

SELEGATO, D. M. **Proposição de uma nova vacina para brucelose bovina usando uma abordagem biotecnológica.** 2013.

SOLA, M. C. et al. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer Goiânia: 2014.

SZYFRES, B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Communes al Hombre y a Los Animales. Washington: Organización Panamericana de la Salud., 2003.

TENÓRIO, T.G.S. et al. Pesquisa de Fatores de Risco para a Brucelose Humana Associados à Presença de Brucelose Bovina no Município de correntes, Estado de Pernambuco, Brasil. São Paulo: Arq do Inst de Bio., 2008.

TERRADOT, L. et al. Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. PNAS., 2005.

VEMULAPALLI, R. et al. Identification of an IS711 Element Interrupting the wboA Gene of *Brucella abortus* Vaccine strain RB51 and a PCR Assay to Distinguish Strain RB51 from Other *Brucella* species and Strains. Clinic and Diag. Lab. Immu., 1999.

VERGER, J.M. et al. Brucella, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int J Syst Bacteriol. 1985.

WHATMORE, A. M. et al., *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.) Inter J of Systematic and Evolutionary Microb., 2014.

WHATMORE, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol., 2009.

YEO, H. J.; WAKSMAN, G. Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. J of Bact., 2004.

YEO, H. J. et al. Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. 2003.

5. CAPITULO I

“O artigo a seguir foi elaborado a partir das normas da Revista Transboundary and Emerging Diseases”.

DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *BRUCELLA* SP. EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE INDIVÍDUOS COM SINTOMAS DE DOENÇAS REUMATOLÓGICAS.

MOLECULAR AND SEROLOGICAL DETECTION OF *BRUCELLA* SP. IN BIOLOGICAL SAMPLES OF INDIVIDUALS WITH SYMPTOMS OF RHEUMATOLOGICAL DISEASES.

Resumo: Brucelose é uma doença infecto-contagiosa, ocasionada por bactérias, gram-negativas, do gênero *Brucella*, que ocasionam doenças reprodutivas nos animais, e humanos, febre ondulantes e doenças reumatológicas, representando possível risco para a saúde pública. O presente trabalho teve como principal objetivo detectar *Brucella* ssp. em amostras biológicas por meio dos ensaios: sorológico e da reação em cadeia da polimerase (PCR). Amostras biológicas de sangue e soro foram obtidas do banco de amostras de pacientes atendidos no Ambulatório do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP-UFMS). Um total de 38 amostras de soro e sangue foram analisadas, pelo teste de sorológico de aglutinação do antígeno acidificado tamponado em placa (PABA) e pela técnica da PCR com os marcadores B4/B5 para a amplificação de um fragmento de 224 pb do gene bcsp31. Das 38 amostras de soro 65,7% (25/38) foram positivas no PABA, sendo 44,73% (17/38) desse provenientes de indivíduos do sexo feminino e 21,05% (08/38) do sexo masculino. No ensaio da PCR 55,26% (21/38) das amostras de sangue foram positivas, sendo (7/38) 18,42% do sexo masculino e 36,84% (14/38) do sexo feminino. Os fragmentos 224 pb amplificados (amostras testes e os controles positivos com DNA de *B. abortus* e *B. canis* isoladas) foram克隆ados em pGEMT easy e sequenciados. As amostras testes sequenciadas apresentaram similaridade genética > 98,8% quando comparadas com outras espécies de *Brucella*, sendo possível observar polimorfismo em quatro nucleotídeos em algumas das sequências. Associando os resultados obtidos nos ensaios laboratoriais com a ficha clínica dos indivíduos, foi possível estabelecer fatores de risco associados à brucelose em que 28,94% (11/38) dos indivíduos indicaram habitar em área rural e 18,42% (7/38) indicaram exercem funções em área rural; os dois grupos somados representaram 47,36% do total (18/40), sendo que todos esses indivíduos estão expostos ao convívio com animais. Com base nos presentes resultados, foi possível evidenciar a presença de *Brucella* sp. nas amostras estudadas e que há uma grande necessidade de novas pesquisas voltadas ao diagnóstico da brucelose humana associada a clínica reumatologia.

Palavras-chave: Saúde pública, diagnóstico sorológico e molecular, doenças articulares.

Summary: Brucellosis is an infectious and contagious disease caused by gram-negative bacteria belonging to the genus *Brucella*, which may cause severe injuries to animals and humans, representing public health risk. The present work aimed the detection of *Brucella* in biological samples using serological and polymerase chain reaction (PCR) assays. Biological samples (blood and serum) were obtained from the sample database of patients treated at the Ambulatory of the Rheumatology Service of the Maria Aparecida Pedrossian University Hospital, Federal University of Mato Grosso do Sul (HUMAP-UFMS). A total of 38 serum and blood samples were analyzed by the agglutination test PABA and the PCR, respectively. The genetic markers B4 / B5 that amplify a 224 bp fragment of the bcsp31 gene specific to the genus *Brucella* were used in PCR essays. Of the 38 serum samples, 65.7% (25/38) were positive, 44.73% (17/38) of which from female individuals and 21.05% (08/38) of males. PCR indicated 55.26% (21/38) of positivity among the blood samples, being 18.42% (7/38) from males and 36.84% (14/38) from females. The 224 bp fragments amplified (test samples and positive controls from isolates of *B. abortus* and *B. canis*) were cloned with pGEMT easy and

sequenced. Sequences showed genetic similarity > 98.8% with other species of *Brucella*, and polymorphism in four nucleotides according to some samples. By associating the present results with the clinical record of the individuals, it was possible to establish risk factors associated with brucellosis, as well as verify that 28.94% (11/38) of the individuals live in rural areas and 18.42% (7 / 38) exercise work activities in rural areas, the two groups together represented 47.36% (18/40) of the total; all individuals live together with animals. The present results confirmed the presence of *Brucella* sp. in the samples studied. Therefore, there is a great need for further research regarding the diagnosis of brucellosis in humans associated with clinical rheumatology.

Keywords: Public health, molecular and serological diagnosis, joint diseases.

5.1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose altamente infecciosa, que acomete os seres humanos, animais domésticos e silvestres. A incidência anual estimada da brucelose em humanos mundial é de aproximadamente 500 mil casos (Pappas et al., 2006).

No Brasil, as informações sobre esta doença, embora sejam escassas, podem estar correlacionadas à estrutura de diagnóstico, a qual é introdutória. Entretanto, os esforços são intensos na implantação e implementação de técnicas diagnósticas. É importante destacar que, a brucelose amplamente distribuída no Brasil e em diferentes grupos ocupacionais, uma vez que profissionais que trabalham em contato direto com animais têm maior risco de contrair o patógeno (Ramos et al., 2006; Tenório & Paulo., 2008; Santos, 2013).

As espécies de *Brucella* são transmitidas aos seres humanos principalmente pela manipulação de carcaças de animais infectados, material de aborto ou parto, ou pela ingestão de derivados do leite contaminados (Szyfres, 2003).

No Brasil, o primeiro registro de *Brucella* foi em 1914, quando o médico Carlos Danton Seixas diagnosticou a febre de Malta (= brucelose) na cidade de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. No Ceará, três anos depois, Thomaz Pompeu Sobrinho observou abortos constantes, porém não epidêmicos, em ovinos, equinos e bovinos. (Selegato, 2013).

Atualmente, doze espécies de *Brucella* são conhecidas e distribuídas entre grupos preferenciais de hospedeiros, sendo elas *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. canis* (canídeos), *B. ovis* (ovinos), *B. neotomae* (rato-do-deserto), *B. microti* (camundongo-do-campo), *B. ceti* (golfinhos e baleias), *B. pinnipedialis* (focas), *B. inopinata* (humano), *B. papionis* (babuínos) e *B. vulpis* (raposa) (Whatmore, 2009; Carvalho et al., 2010; Whatmore et al., 2014; Scholz et al., 2016).

Nos humanos, a sintomatologia da brucelose é muitas vezes inespecífica, portanto é importante obter um histórico detalhado, que inclua a ocupação, o contato com animais, viagens a áreas endêmicas e a ingestão de alimentos de risco, bem como saber que qualquer

órgão ou tecido do corpo pode ser virtualmente acometido pelo agente etiológico da doença (Maria et al., 2010).

Ciente de que a brucelose em humanos tem como principal fonte de infecção os animais reservatórios, é importante ressaltar que, dentre as zoonoses, esta representa um risco à saúde pública com caráter persistente, de difícil tratamento, controle e erradicação, fato que é complicado ainda mais pela forma como se realiza o diagnóstico (Notici et al., 2008).

O método de diagnóstico laboratorial para brucelose utilizado atualmente na rede do Sistema Único de Saúde (SUS) é apenas o teste sorológico por reação de aglutinação rápida com antígenos de *Brucella abortus* acidificado tamponado, (Ministério da Saúde, 2005)

Entretanto, essa metodologia não é a ideal devido reações cruzadas que pode ocorrer com outros antígenos bacterianos, e a baixa sensibilidade no fase subclínica da brucelose. Portanto, devido às limitações no diagnóstico de *Brucella* spp., a reação em PCR pode ser útil, e vários estudos estão sendo realizados para o aprimoramento de ensaios no diagnóstico da brucelose. Além disso, a PCR possuem alta sensibilidade e especificidade para a detecção de *Brucella* spp. de sangue, tecidos e outras amostras clínicas .

De acordo com a problemática discutida anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo realizar os ensaios sorológicos e moleculares para detecção de *Brucella* em amostras de soro e sangue em pacientes com históricos de doenças reumatológicas, bem como avaliar possíveis fatores de risco à doença de acordo com as informações disponíveis, relativas ao banco de dados disponível.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção e descrição das amostras biológicas

Para realização do trabalho foram obtidas 38 amostras biológicas (sangue e soro dos mesmos indivíduos) de um banco de pacientes atendidos no Ambulatório de Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP-UFMS), criado em 2016; para durante a estudo do agente etiológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari (Doença de Lyme-Símile brasileira) em pacientes com doenças reumatológicas. Para acessar o banco de amostras biológicas e os dados clínicos dos pacientes, o projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Católica Dom Bosco (CAAE 90821118.5.0000.5162, número 2.805.170).

As 38 amostras foram provenientes de indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, sendo 68,42% (26/38) do sexo feminino e 31,57% (12/38) do sexo masculino. Após os resultados dos testes diagnósticos, com a finalidade de se avaliar possíveis diferenças na prevalência de brucelose entre o sexo dos indivíduos e o histórico clínico de

doença reumatólogica, uma análise de regressão logística ($p < 0,05$) e a razão da chance (*odds ratio* [OR]) foi calculada em que $0 < \text{OR} < 1$ indica relação negativa entre as variáveis (fator de proteção), $\text{OR} = 1$ indica ausência de relação entre as variáveis e $\text{OR} > 1$ indica relação positiva entre as variáveis (fator de risco), além disso, o intervalo de confiança (95%) do modelo também foi estimado, sendo que se o valor 1 estiver incluído no intervalo o modelo é considerado nulo (Dohoo et al., 2003).

5.2.2 Teste de Sorologia

O ensaio do antígeno acidificado tamponado em placa (PABA) foi realizado com antígenos adquirido no Serviço de Sanidade Animal da Delegacia Federal de Agricultura (SSA/DFA)/ MAPA, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TEC PAR) obedecendo aos padrões internacionais. O teste sorológico foi realizado com antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o corante rosa de bengala (RB). As 38 amostras de soros testes foram submetidas ao protocolo padronizado para o ensaio do PABA: 30 μL de soro teste adicioando a 30 μL do antígeno, homogeneizados com ponteira por um minuto e aguardado a formação de grumos, indicando assim resultados positivos (Jardim et al., 2006).

5.2.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras biológicas de sangue total com o KIT DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN), segundo instruções do fabricante.

A qualidade e quantidade do DNA extraído foram verificadas por eletroforese em gel de agarose (1,0%), corado com Brometo de etídeo e visualizado por transiluminador com fonte de luz ultra violeta Gel Doc XR e o software Image Lab TM.

5.2.4 Detecção de *Brucella* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores B4F (5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') e B5R (5'-CGCGCTTGCCTTCAGGTCTG-3') (Baily, 1992), que amplificam uma sequência de aproximadamente 223 pares de base (pb) do gene que codifica a proteína periplasmática imunogênica BCSP31 específica de bactérias do gênero *Brucella* (Fernandes et al., 2011). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com volume final de 12,5 μL . O ensaio consistiu-se de 1,25 μL de tampão 10X, 0,75 μL de MgCl₂ (50 mM), 0,25 μM de dNTPs (10 mM), 0,25 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 μM), 0,1 μL de *taq* DNA polimerase recombinante Invitrogen[®] (5 U), 8,025 μL de H₂O ultrapura e 1 μL de DNA molde (aproximadamente 50 ng). As condições de ciclagem da

PCR foram às seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30s, anelamento a 49,9°C por 30s e extensão a 72°C por 30s, seguidos de extensão final a 72°C por 7min.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose (1,2%) submetidos à eletroforese por 55 minutos a 75V e corados com brometo de etídio na concentração de 5 mg/ml. Para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador molecular 1Kb plus (Invitrogen®). As bandas foram visualizadas em aparelho transiluminador com fonte de luz ultravioleta Gel Doc XR controlado pelo software Image Lab™.

5.2.5 Clonagem e sequenciamento

Os produtos de PCR amplificados foram submetidos à reação de ligação com o plasmídeo pGEMT easy. A reação de cloangem foi realizada com 5uL da reação de ligação transformados em células quimicamente competentes TOP10 F' de *Escherichia coli* e plaqueados em placa de petri contendo meio de cultura Luria Bertani (LB). Após esse período, o material foi plaqueado em meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/µl, X-Gal 25µg/µl e IPTG 100mM.

As colônias crescidas, as quais foram selecionadas pelo método colorimétrico (branco e azul) e as colônias brancas foram selecionadas. Duas colônias de cada amostra foram expandidas em 10 ml de meio LB com 10µL de ampicilina na concentração final de 100µg/µL sob agitação de 200rpm a 37°C por 16 horas. Após o crescimento das colônias em meio líquido foi realizada a extração do DNA plasmidial pelo Kit MiniPrep Promega®.

Após confirmação da presença do inserto pela PCR, os plasmídeos foram enviados para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA (Rio Grande do Sul, Brasil), com os oligonucleotídeos iniciadores universais M13 forward e reverse. Os contíguos das sequencias dos plasmídeos foram então obtidos, as sequências do gene clonado foram identificadas através de seus oligonucleotídeos iniciadores nos flancos, extraídas para análise e comparadas com a base de dados através da ferramenta Megablast, utilizando o programa Geneious (Biomatters, versão 9.0). Os controles positivos da PCR DNA de *B. abortus* e *B. canis* também foram clonados e sequenciados.

5.2.6 Alinhamentos e comparações gênicas

Para fins comparativos, todas as sequências relativas ao gene bcspl (específico do gênero *Brucella*) foram obtidas na base de dados do GenBank e alinhadas com aquelas obtidas no presente estudo. Os alinhamentos gênicos foram realizados utilizando o algoritmo E-INS-i do programa MAFFT (Katoh et al., 2002) implementado no programa Geneious (Biomatters,

versão 9.0). Após um alinhamento preliminar, foram selecionadas sequencias com base nos seguintes critérios: ao menos uma de cada espécie de *Brucella*, biovares diferentes quando pertinente e aquelas que se apresentam *loci* com polimorfismos (Tabela 1). Todas as sequencias obtidas no presente estudo serão depositadas na base de dados do GenBank, após aceite formal do artigo.

Tabela 1: Espécies de *Brucella* obtidas na base de dados GenBank utilizadas na análise de similarida, associadas aos respectivos números de acesso.

Espécie	Nº acesso	Espécie	Nº acesso
<i>B. abortus</i>	CP007790	<i>B. microti</i>	CP001578
<i>B. abortus</i>	CP007705	<i>B. ovis</i>	CP000708
<i>B. abortus</i>	KT592382	<i>B. pinnipedialis</i>	CP002078
<i>B. canis</i>	CP003174	<i>B. suis</i>	CP007719
<i>B. ceti</i>	CP006896	<i>B. suis</i>	CP007717
<i>B. inopinata</i>	ADEZ010000008	<i>Brucella</i> sp.	CP016979
<i>B. melitensis</i>	CP002459	<i>Brucella</i> sp.	CP019390
<i>B. melitensis</i>	CP007760	<i>Brucella</i> sp.	LT599047
<i>B. melitensis</i>	CP016983	<i>Brucella</i> sp.	LT605585
<i>B. melitensis</i>	CP018494		

5.3 RESULTADOS

Com base nos resultados de PABA e PCR, 71,8% (28/38) das amostras foram positivas em um ou ambos os ensaios (Tabela 2). Das amostras de soro submetidas ao PABA, 65,7% (25/38) foram positivas, sendo 44,73% (17/38) do sexo feminino e 21,05% (08/38) do sexo masculino. (Tabela 2).

Foi possível observar que 28,94% (11/38) dos indivíduos pelos quais as amostras biológicas foram originadas moram em área rural e 18,42% (7/38) exercem função em área rural, sendo que esses dois grupos somados representaram 47,36% do total (18/38), sendo que estes indivíduos estão expostos ao convívio com animais (Tabela 2).

Tabela 2: Amostras avaliadas no presente estudo relacionadas às respectivas informações acerca dos fatores de risco, avaliação clínica e patologia, e resultados dos ensaios PABA e PCR.

Amostras*	Fator de risco	Avaliação Clínica Patologia (Q/P)**	Sexo	PABA	PCR
1	Convívio em área rural e de mata	Osteomuscular	Masculino	Negativo	Negativo
2	Convívio em área rural	Osteomuscular	Feminino	Positivo	Negativo
3	convívio em área rural	Osteomuscular	Feminino	Negativo	Positivo
4	Exerce atividade profissional em área rural	Osteomuscular	Masculino	Positivo	Positivo
5		Osteomuscular	Feminino	Negativo	Negativo

6	Convívio em área rural	Osteomuscular	Feminino	Negativo	Negativo
7	Convívio em área rural e de mata	Osteomuscular; Miosite	Masculino	Positivo	Negativo
8		Osteomuscular	Feminino	Positivo	Positivo
9		SSA**	Feminino	Positivo	Positivo
10		Osteomuscular	Feminino	Positivo	Negativo
11		Osteomuscular	Masculino	Positivo	Positivo
12		Osteomuscular; Mialgia; Artrite	Feminino	Negativo	Positivo
13	Convívio em área rural	Osteomuscular	Feminino	Negativo	Positivo
14	Convívio em área rural	Osteomuscular; Artralgia; Artrite	Feminino	Positivo	Positivo
15	Convívio em área rural	Osteomuscular	Feminino	Positivo	Positivo
16		Osteomuscular	Feminino	Positivo	Positivo
17	Atividade profissional em área rural	Osteomuscular	Feminino	Positivo	Negativo
18		Osteomuscular	Feminino	Positivo	Positivo
19	Atividade profissional em área rural	Osteomuscular; Artrite; Deformação	Feminino	Positivo	Positivo
20		Miosite	Feminino	Positivo	Positivo
21		Osteomuscular	Feminino	Positivo	Negativo
23		Osteomuscular	Masculino	Positivo	Positivo
24	Convívio em área rural	Osteomuscular	Masculino	Positivo	Positivo
25	Atividade profissional em área rural	Osteomuscular	Masculino	Positivo	Positivo
26		Osteomuscular	Masculino	Negativo	Negativo
27	Exerce atividade profissional em área rural	Osteomuscular	Feminino	Positivo	Positivo
28		SSA***	Feminino	Negativo	Negativo

29		Osteomuscular	Feminino	Positivo	Positivo
30		Osteomuscular	Masculino	Positivo	Positivo
31		Osteomuscular	Feminino	Positivo	Positivo
32		SSA***	Feminino	Negativo	Negativo
33	Exerce atividade profissional em área rural	Osteomuscular	Feminino	Negativo	Negativo
34	Refere convívio em área rural	Osteomuscular	Feminino	Positivo	Positivo
35		SSA***	Feminino	Positivo	Negativo
36		Mialgia; Artralgia	Masculino	Negativo	Negativo
37	Exerce atividade profissional em área rural	Osteomuscular	Feminino	Negativo	Negativo
38		Mialgia; Artralgia; Artrite	Masculino	Negativo	Negativo
39		Mialgia; Artralgia	Masculino	Positivo	Negativo

*As amostras 22 e 40 foram excluídas do trabalho por não haver correspondência na numeração entre os frascos de soro e sangue, **Q/P = queixas principais dos pacientes, ***SSA= Sem Sintomas Articulares.

Dos resultados obtidos a partir do ensaio de PCR, 55,26% (21/38) das amostras apresentaram resultados positivos, sendo que 18,42% (7/38) das amostras foram provenientes de indivíduos do sexo masculino e 36,84% (14/38) do feminino (Tabela 2).

As análises estatísticas indicaram que não houve diferença na prevalência da brucelose entre os sexos ($p= 0,980$) bem como não houve entre os indivíduos com clínica de doenças reumatológicas e os que não apresentaram essa clínica ($p= 0,955$).

Cabe destacar que, em alguns casos, os resultados dos ensaios PABA e PCR não foram congruentes, em que as amostras 3, 12 e 13 foram positivas apenas na PCR e as amostras 2, 7, 10, 17, 21, 35 e 39 positivas no PABA (Tabela 2).

Os produtos obtidos na PCR e clonados foram sequenciados (amostras testes e os controles positivos DNA de *B. canis* e *B. abortus*) e um fragmento de 224pb correspondendo ao gene *bcsp31* foi obtido. A similaridade genética das amostras sequenciadas foram $> 98,8\%$ quando confrontadas pelo Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) com as outras espécies

de *Brucella*. Todas as sequências obtidas no presente estudo, apresentaram polimorfismo de quatro nucleotídeos nos primeiros quatro pares de bases do gene, referentes a região de alinhamento do oligonucleotídeo iniciador B4 em relação as sequencias de *Brucella* spp. depositadas no GenBank (Figura 1).

Excetuando o polimorfismo observado nas sequencias, foi possível observar a presença de dois genótipos G1 e G2, amplificados a partir das amostras de sangue. Sendo que G1 eo controle positivo *B. canis* foram 100% similares a outras sequencias de *Brucella* spp., enquanto que G2 e o controle positivo *B. abortus* apresentaram variações de um e dois polimorfismos adicionais, respectivamente, representando genótipos únicos quando confrontados com a base de dados (Figura 1). *Brucella inopinata*, *B. melitensis*, *B. suis* e duas espécies não identificadas a nível específico também apresentaram polimorfismos (Figura 1).

Vale destacar que os polimorfismos encontrados não representaram alteração na sequência de aminoácidos, exceto nos três primeiros das sequencias obtidas no presente estudo que resultaram em substituição de um resíduo de glicina (GGC) por isoleucia (ATT), também ocorreu um alteração como o resíduo 31 do controle de *B. abortus* em que uma treonina (ACC) foi substituída por isoleucina (ATC) (Figura 1). As similaridades genéticas entre todas as amostras estão representadas na Figura 2, e mostra que as quatro sequências obtidas no presente estudo são mais similares entre si quando comparadas às sequencias obtidas a partir da base de dados.

Figura 1. Alinhamento dos nucleotídeos e respectivos resíduos de aminoácidos (iniciando no *frame 2*) referentes a proteína BSP 31 das sequencias de *Brucella* spp., geradas no presente estudo e obtidas na base de dados do GenBank (associadas aos respectivos números de acesso). Estão discriminados apenas o consenso e os respectivos polimorfismos. As quatros primeiras sequencias (*Brucella_G1*, *Brucella_G2*, *B. abortus* e *B.canis*) foram obtidas no presente estudo.

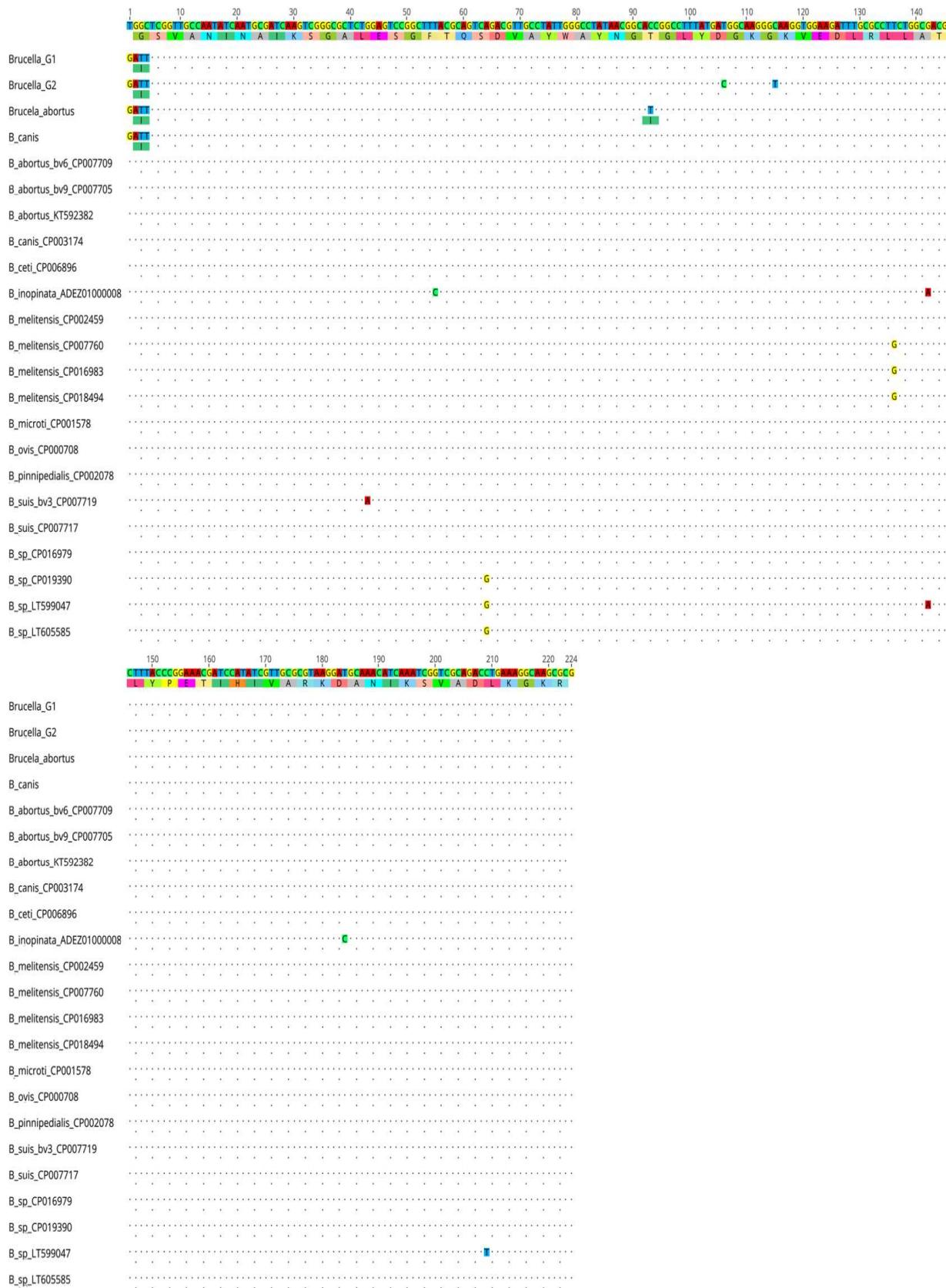


Figura 2. Matriz de similaridade genética entre as sequências do gene *bcsp* 31 de *Brucella* spp., obtidas no presente estudo e da base de dados do GenBank, utilizadas no alinhamento genético. As 4 primeiras sequências (*Brucella_G1*, *Brucella_G2*, *Brucella_abortus* e *B_canis*) foram obtidas no presente estudo. O gradiente de cores varia da seguinte forma: quanto mais escuro, maior a similaridade genética.

	<i>Brucella_G1</i>	<i>Brucella_G2</i>	<i>Brucella...</i>	<i>B_canis</i>	<i>B_abortu...</i>	<i>B_abortu...</i>	<i>B_abortu...</i>	<i>B_canis_...</i>	<i>B_ceti_C...</i>	<i>B_inopin...</i>	<i>B_melite...</i>	<i>B_melite...</i>	<i>B_melite...</i>	<i>B_melic...</i>	<i>B_microti...</i>	<i>B_ovis_C...</i>	<i>B_pinnip...</i>	<i>B_suis_b...</i>	<i>B_suis_C...</i>	<i>B_sp_CP...</i>	<i>B_sp_CP...</i>	<i>B_sp_LT...</i>	<i>B_sp_LT...</i>		
<i>Brucella_G1</i>		99.11%	99.55%	100%	98.21%	98.21%	98.21%	98.21%	98.21%	96.88%	98.21%	97.77%	97.77%	97.77%	98.21%	98.21%	97.77%	98.21%	98.21%	97.77%	98.21%	97.77%	96.88%	97.77%	
<i>Brucella_G2</i>	99.11%		98.66%	99.11%	97.32%	97.32%	97.31%	97.32%	97.32%	95.98%	97.32%	96.88%	96.88%	96.88%	97.32%	97.32%	97.32%	96.88%	97.32%	97.32%	96.88%	95.98%	96.88%	97.77%	
<i>Brucella_abortus</i>	99.55%	98.66%		99.55%	97.77%	97.77%	97.76%	97.77%	97.77%	96.43%	97.77%	97.32%	97.32%	97.32%	97.77%	97.77%	97.77%	97.77%	97.77%	97.77%	97.77%	97.32%	96.43%	97.32%	
<i>B_canis</i>	100%	99.11%	99.55%		98.21%	98.21%	98.21%	98.21%	98.21%	96.88%	98.21%	97.77%	97.77%	97.77%	98.21%	98.21%	97.77%	98.21%	98.21%	97.77%	98.21%	97.77%	96.88%	97.77%	
<i>B_abortus_bv6_CP007709</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%		100%	100%	100%	100%	98.66%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_abortus_bv9_CP007705</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%		100%	100%	100%	98.66%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_abortus_KT592382</i>	98.21%	97.31%	97.76%	98.21%	100%	100%		100%	100%	98.65%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.65%	99.55%	
<i>B_canis_CP003174</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%	100%	100%		100%	98.66%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_ceti_CP006896</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%	100%	100%	100%		98.66%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_inopinata_ADEZ0100000...</i>	96.88%	95.98%	96.43%	96.88%	98.66%	98.66%	98.65%	98.66%	98.66%		98.66%	98.21%	98.21%	98.21%	98.66%	98.66%	98.66%	98.21%	98.66%	98.66%	98.21%	98.21%	98.21%	98.21%	
<i>B_melitensis_CP002459</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%	100%	100%	100%	100%	98.66%		99.55%	99.55%	99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_melitensis_CP007760</i>	97.77%	96.88%	97.32%	97.77%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%		98.21%	99.55%	99.55%	100%	100%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.11%	98.21%	99.11%	
<i>B_melitensis_CP016983</i>	97.77%	96.88%	97.32%	97.77%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%		98.21%	99.55%	100%	100%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.11%	98.21%	99.11%	
<i>B_melitensis_CP018494</i>	97.77%	96.88%	97.32%	97.77%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%		98.21%	99.55%	100%	100%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.11%	98.21%	99.11%
<i>B_melicoti_CP001578</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%	100%	100%	100%	100%	98.66%		99.55%	99.55%	99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_ovis_CP000708</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%	100%	100%	100%	100%	98.66%	100%		99.55%	99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_pinnipedialis_CP002078</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%	100%	100%	100%	100%	98.66%	100%	99.55%		99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_suis_bv3_CP007719</i>	97.77%	96.88%	97.32%	97.77%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%		99.11%	99.11%	99.11%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.11%	98.21%	99.11%	
<i>B_suis_CP007717</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%	100%	100%	100%	100%	98.66%	100%	99.55%	99.55%	99.55%		99.55%	100%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_sp_CP016979</i>	98.21%	97.32%	97.77%	98.21%	100%	100%	100%	100%	100%	98.66%	100%	99.55%	99.55%	99.55%	100%		99.55%	100%	100%	100%	100%	99.55%	98.66%	99.55%	
<i>B_sp_CP019390</i>	97.77%	96.88%	97.32%	97.77%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	98.21%	99.55%	99.11%	99.11%	99.11%	99.55%		99.55%	99.11%	99.55%	99.55%	99.55%	99.11%	99.11%	100%	
<i>B_sp_LT599047</i>	96.88%	95.98%	96.43%	96.88%	98.66%	98.65%	98.66%	98.66%	98.66%	98.21%	98.66%	98.21%	98.21%	98.21%		98.66%	98.66%	98.21%	98.66%	98.66%	98.66%	99.11%	99.11%		
<i>B_sp_LT605585</i>	97.77%	96.88%	97.32%	97.77%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	99.55%	98.21%	99.55%	99.11%	99.11%	99.11%	99.55%	99.55%		99.55%	99.11%	99.55%	99.55%	99.11%	99.11%		

5.4 DISCUSSÃO

Com base nos ensaios PABA e PCR, foi possível observar que em algumas amostras os resultados não foram congruentes. Este fato, provavelmente está relacionado aos aspectos biológicos da bactéria no organismo do hospedeiro. Sabe-se que os sítios preferenciais de infecção por *Brucella* spp. são as regiões articulares, com grande afinidade pelo líquido sinovial. Como o material biológico utilizado para extração de DNA para PCR foi o sangue, isto pode explicar ausência de positividade em tais ensaios. Por outro lado, a sorologia que detecta anticorpos, pode se mostrar positiva. Cabe destacar que vários estudos têm usado sangue como fonte de DNA para PCR na detecção de *Brucella* spp., demonstrando alta sensibilidade e especificidade (Keid et al., 2017; Rahdar, et al., 2018; Oliveira et al., 2019).

Cabe destacar que o diagnóstico definitivo da brucelose baseia-se no isolamento da bactéria. Todavia, este método apresenta relativa lentidão e taxa de isolamento variável (dependente de duração de infecção e métodos usados), por isso, na maioria dos casos são usados métodos sorológicos (Lebre et al., 2013). E ainda, de acordo com Lebre et al. (2013), o diagnóstico definitivo da brucelose requer o isolamento do agente etiológico no sangue, medula óssea ou outros tecidos ou fluidos biológicos.

A probabilidade de isolamento da bactéria em cultura de sangue depende da fase da infecção e da técnica de cultura usada, com valores entre 80-90% em fase aguda e 30-70% em fase crônica. Por outro lado, as bactérias do gênero *Brucella*, podem sobreviver em macrófagos e osteoblastos, os quais levam à produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz, induzindo inflamação e resultando gradualmente em lesões articulares (Kahlenberg, 2011).

Com isso, os fatores de virulência desempenham papel essencial na interação macrófago-bactérias e, consequentemente, na evasão ao sistema imune. Dessa forma, em alguns casos onde a produção de anticorpos ainda é indetectável na sorologia, pode-se detectar o DNA da bactéria no sangue do indivíduo (circulando dentro de macrófagos), explicando assim a ausência de positividade no exame sorológico e sua presença no ensaio de PCR. A característica principal das bactérias é a capacidade de sobreviver dentro dos macrófagos; a penetração neste constitui também um mecanismo de escape da bactéria e permitindo a ela permanecer mais tempo dentro do organismo, circulando na corrente sanguínea (Machado et al, 2019).

Com os resultados obtidos foi possível observar que apesar de a prevalência de *Brucella* não apresentar diferenças significativas entre os sexos, indivíduos do sexo feminino tenderam a demonstrar maiores valores, fato que está em desacordo com a literatura (Tasova et al.,

1999). Tal fato pode sugerir relações de cultura regional por grande participação feminina nas atividades do campo (Tasova et al., 1999). Com base num estudo realizado pela Sociedade Portuguesa de Reumatologia, na última década ocorreu uma redução do número de casos de brucelose em Portugal, que apresentava a maior incidência da doença em indivíduos do sexo masculino (Santiago et al., 2011).

A ausência de diferenças estatística na prevalência de brucelose entre os sexos pode estar relacionada ao pequeno tamanho da amostra (apenas 38 indivíduos), fato que pode induzir a erro estatístico do tipo I (Zar, 2010). A ausência de diferenças na prevalência de *Brucella* entre indivíduos com ou sem sintomas de doenças reumatológicas pode estar relacionado ao que foi ressaltado anteriormente, bem como pelo fato de que a avaliação clínica original não apresentou enfoque específico em brucelose e doenças reumatológicas, mas sim na Síndrome de Baggio-Yoshinari como ressaltado na metodologia. Dessa forma, informações importantes podem ter sido omitidas.

Cabe destacar que, nas informações provenientes dos indivíduos os quais as amostras biológicas foram obtidas, 1/3 das amostras provieram daqueles que moram em áreas rurais e quase 1/2 convive com animais, fato que reforça os fatores de risco associados à infecção por *Brucella*.

Os alinhamentos das sequências correspondentes ao gene bcsp31 de *Brucella* spp. revelaram certa estabilidade genética, todavia alguns polimorfismos foram encontrados. A maioria destes polimorfismos não causou alteração na sequência dos resíduos de aminoácidos, exceto aqueles observados nas sequências obtidas no presente estudo. Os quatro primeiros nucleotídeos das sequências, apresentaram polimorfismos relativos à alta conservação notada em outras sequências do banco de dados. Estes nucleotídeos correspondem à região de anelamento do oligonucleotídeo iniciador B4 (Baily et al., 1992), fato que pode ter relação com a dificuldade de amplificação em alguns ensaios de PCR realizados durante o estudo. Esses mesmos polimorfismos levaram a substituição de um resíduo de glicina por um de isoleucina, bem como este último resíduo substituiu uma treonina na sequência do isolado de *B. abortus*. Pode ser que essas alterações na sequência de aminoácidos causem alterações na proteína sintetizada e, por consequência influenciar a virulência da bactéria. Estudos futuros são necessários para confirmação dessa premissa.

Devido ao alto grau de conservação nas sequências do gene bcsp31 de *Brucella* spp, não foi possível inferir a espécie de *Brucella* com suporte suficiente a partir do material genético encontrado nas amostras de sangue. Para identificação de espécies de *Brucella* se faz necessário a utilização de outros marcadores moleculares como, por exemplo, aqueles que

amplifiquem as regiões variáveis do Cromossomo II (García et al., 2006). Apesar de não identificarmos a espécie de *Brucella* foi possível observar uma alta similaridade genética entre as quatro sequências obtidas no presente estudo, fato que pode estar relacionado à proximidade geográfica onde as amostras foram obtidas, bem como *B. inopinata* se mostrou bastante divergente em relação às outras (ver Figura 2 para mais detalhes).

Cabe ressaltar que os dados obtidos são de grande relevância devido à escassez de informações sobre a prevalência de brucelose em humanos no Brasil. Além disso, a doença apresenta caráter crônico e não faz parte do grupo de doenças com notificação obrigatória. As notificações são realizadas em caso de surtos, dessa forma, os casos isolados passam despercebidos (Soares et al., 2015). Como dito anteriormente, a brucelose é uma doença de grande morbidade e está correlacionada a várias complicações, principalmente, as osteoarticulares, que ocorrem em até 60% dos casos (Mello et al., 2007). Em relação ao presente estudo, foi possível observar que 32% dos pacientes com doenças reumatológicas apresentaram sorologia positiva para brucelose. Dessa forma, vale investigar os quadros relativos a essas enfermidades, pois esses são comuns em 20 a 40% dos casos de brucelose humana, em que ocorre envolvimento de artrite periférica, sacroileite e espondilolistese (Sampaio et al., 2004).

Casos de brucelose correlacionados a espondilodiscites e demais alterações na coluna vertebral, principalmente lombar, são descritos na literatura e acabam por limitar o trabalho do indivíduo. Em situações ainda mais severas, são descritas encefalite, meningite (neurobrucelose), neurites periféricas e endocardite bacteriana (2%), as quais podem culminar em óbito caso não diagnosticadas precocemente de forma correta (Calderaro et al., 2003). De acordo com estudos de Lebre et al., 2013 se referindo a um estudo imanológico, viu-se que em 97,6% dos doentes que realizaram ressonância magnética da coluna apresentaram alterações sugestivas de espondilodiscite. A tomografia computorizada da coluna foi realizada em 32 (59,3%) doentes, apresentando 81,3% (26/32) de achados sugestivos para espondilodiscite. Outros autores corroboram a informação de que a espondilodiscite ocorre predominantemente na coluna, mais frequentemente no segmento lombar. Atinge characteristicamente e de forma precoce, a região anterior da face superior do corpo vertebral, evoluindo para lesões erosivas, com ou sem formação de abcessos paravertebrais e posterior fusão dos corpos vertebrais. O espectro de lesões osteo-articulares inclui ainda tenossinovites e bursites (Zompala et al., 2000).

Os resultados obtidos mostraram alta prevalência de brucelose nas amostras estudadas, e isso chama a atenção para um perigo de saúde pública, devido à morbidez que a doença

causa. Com isso são necessárias as associações de métodos diagnósticos, sinais clínicos e ensaios laboratoriais (PABA e PCR) para o diagnóstico da doença, bem como é interessante que os profissionais de medicina considerem a pesquisa de *Brucella* spp. como possíveis precursores de doenças reumatológicas.

5.5 REFERÊNCIAS

Al Dahouk. S., Nockler, K., (2011). Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 9,833-45.
doi: 10.1586/eri.11.55

Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar., B.S., Stoker, N.G. (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *The Journal of tropical medicine and hyg* 95, 271-275.

BRASIL. Ministério da Saúde, (1999). Fundação Nacional de Saúde; Centro Nacional de Epidemiologia. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Brasília: Ministério da Saúde, 35-36.

Calderaro, D.G., Tatiana, F.G., Bagnatori, Renato, S, Caramelli, B.(2003) Espondilodiscite como manifestação clínica de endocardite infecciosa. *Arq. Bras. Cardiol.*, 5, 526-527.
doi: 10.1590/S0066-782X2003001300009

Crawford P. R., Huber J. D., Adams B. S. Epidemiology and surveillance. In: Nielsen K.; Duncan J.R. (ed.) *Animal brucellosis*. (1990) USA, 139-141.

Dohoo I, Martin W, Stryhn H. (2003). Veterinary epidemiologic research. AVC Inc., Charlottetown.

Fernandes, A.R.F., Azevedo, S.S., Piatti, R.M., Pinheiro, E.S., Genovez, M.É.,Azevedo, A.S., Batista, C.S.A., Alves, C.J. (2011). *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba State, Brazil. *Braz J of Microb* 1405-1408.
doi:10.1590/S1517-83822011000400023

Jardim, G.C., et al. (2006). Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucellaabortus*. *Pesq. Vet. Bras.*, 177-182.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Myiata, T. (2002).MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nuc Acids Research*, 30, 3059–3066.

Kahlenberg, J.M., (2011). Avanços no Tratamento Médico da Artrite Reumatóide. *Mão Clinics*, 27, 11-20.

Kreader, C.A., (1996). Alívio da inibição da amplificação em PCR com albumina sérica bovina ou proteína 32 do gene T4. *Microbiologia Aplicada e Ambiental*, 3, 1102-1106.

Lebre, A et al., Espondilodiscite Brucélica: Casuística dos Últimos 25 Anos Brucellar Spondylodiscitis: Serviço de Doenças Infecciosas. (2013). Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Portugal. *Acta Med. Port.*,v, 3, 204-210.

Machado, P. R. L et al., Mecanismos de resposta imune às infecções. (2019) 647-662.

doi: 10.1590/S0365-05962004000600002

Maria, L.J.L., Patricia, M.O., Mauro, R.E., Nelma, C.F., Karina, R.L.J.C. (2010): Estado da arte da brucelose em humanos. *Rev. Pan. Amaz. Saúde*, 4, 75-84.

doi:10.5123/S2176-62232010000400012

Mello, C.C.F., et al. (2007). Espondilodiscite por brucelose: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 4, 469-472.

doi:10.1590/S0037-86822007000400019

Ministério da Saúde. (2011). Define as terminologias adotadas em legislação nacional, disponível em:http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt0104_25_01_2011.html (Acessado em abril de 2018).

Nociti, R.P., et al. (2008). Fatores de risco associados à brucelose em médicos veterinários com predisposição ocupacional em Mato Grosso, Brasil.v,630-636.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E.V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infect Diseases*, 6, 91-99.
doi: [10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)

Protocolo Estadual e Vigilância e Manejo Clínico De Brucelose Humana. (2012). Diretoria de Vigilância Epidemiológica.

Rahdar, H.A., et al. (2018). Diversity of virulence genes in *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* detected from patients with rheumatoid arthritis. *Microb. Pathog.*
doi: [10.1016/j.micpath.2018.03.034](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.034)

Ramos, S., Padilla, M. Maiá., Gutiérrez, F. (2006). A bibliometric analysis of tuberculosis research indexed in PubMed, J. M. Infectious Diseases Unit, Internal Medicine Service, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain.

Sampaio, B, P.D., et al. (2004). Espondiloartropatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica. *Revis Bras de Reumato*. 6, 464-469.
doi: [10.1590/S0482-50042004000600012](https://doi.org/10.1590/S0482-50042004000600012)

Santos, R.L., Martins, T.M., Borges, A.M., Paixão, T.A. (2013). Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesq Vet Bras*. 6,759-764.
doi: [10.1590/S0100-736X2013000600012](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600012)

Selegato, D.M. (2013). Proposição de uma nova vacina para brucelose bovina usando uma abordagem biotecnológica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 124f.

Soares, C.P.O.C., Silva, J.F.F., Teles, J.A.A., Santos, A.F., Silva, S.O.F., Cruz, M.V.R.A. (2015). Prevalência de *Brucella* ssp em Humanos. *Revista. Latino Americana. Enfermagem*, 919-26.

doi: [10.1590/0104-1169.0350.2632](https://doi.org/10.1590/0104-1169.0350.2632)

Szyfres, B. (2003) Zoonosis y enfermedades transmisiblescommunes al hombre y a losanimales. 2.ed. Washington: OrganizacionPanamericana de La Salud, v, 626- 633.

Tasova, Y., Saltogu, S.G., Aksu, H.S. (1999). Osteoarticular. involvement of brucellosis in Turkey. *Clin Rheumatol*, 18, 214-219.

doi:10.1007/s100670050087

Tenório, A.C.S., Paulo, R.M. (2008). Estratégia Saúde da Família. Fundação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, *Revista Saúde Pública*. 42, 921-9.

Zar JH. (2010). Biostatistical analysis, 5th edn. Prentice Hall, New Jersey.

Zompala A, Skopelitis E, Thanos L, Artinopoulos C, Kordossis T, Sipsas NV. An unusual case of brucellar spondylitis involving both the cervical and lumbar spine. (2000). *J of Clin Imaging*, 24, 273-275.

6. CAPÍTULO II

“O artigo a seguir foi elaborado a partir das normas da Revista Acta Tropica”.

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA BRUCELOSE EM HUMANOS NO BRASIL

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF HUMAN BRUCELOSIS IN BRAZIL

Resumo: No Brasil, o conhecimento epidemiológico acerca da brucelose em humanos ainda é lacunar e incipiente, fato que pode representar problema de saúde pública e comprometer a qualidade de vida do indivíduo. O presente estudo teve como objetivo identificar possíveis aspectos epidemiológicos associados à brucelose em humanos no Brasil, com base nos dados do Ministério da Saúde coletados entre os anos de 2013 à 2017, obtidos via sistema eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC). Para avaliar os aspectos epidemiológicos, foram considerados dados de prevalência da brucelose sendo as diferenças neste índice testadas de acordo com o sexo dos indivíduos (masculino e feminino), área de habitação (urbana ou rural), ocupação (se exerce atividade laboral de risco à infecção), faixa etária (criança, adolescente, jovem, adulto, idoso), região do país (Norte, Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste) e ano (2013–2017). Foi constatado que indivíduos do sexo masculino estão mais propensos à infecção por *Brucella*. Indivíduos que habitam áreas urbanas apresentaram maiores prevalências de infecção, pois muitos exercem atividade laboral em áreas rurais periurbanas adquirindo a infecção no local de trabalho. Neste sentido, a ocupação que o indivíduo exerce (trabalho) representa grande risco à infecção, principalmente atividades ligadas de alguma forma à pecuária (criação, matadouro, processamento e beneficiamento de produtos com origem animal), representando caráter zoonótico. A amplitude de idade de 19–59 (jovens e adultos) apresentou as maiores prevalências de brucelose, fato que também está relacionado à atividade laboral, uma vez que tais indivíduos estão em idade de trabalho, a probabilidade e exposição ao patógeno é aumentada. Observou-se também que a distribuição da doença dentre as regiões do Brasil certamente está ligada às atividades pecuárias, sendo o Centro-Oeste a região com maior rebanho de gado de corte do país e, consequentemente, maior prevalência de brucelose. Por fim, a análise temporal da doença demonstrou inconstância e inconsistência, reforçando a premissa de que o sistema de notificação e diagnóstico da brucelose no Brasil ainda é falho resultando no atual conhecimento epidemiológico incipiente. Sendo assim, os aspectos epidemiológicos devem estar atrelados às questões zoonóticas e é de suma importância que a metodologia diagnóstica relacionada à brucelose seja padronizada, melhorada, o esquema de notificação seja obrigatório, eficiente, bem como as informações acerca da doença sejam melhores difundidas na população (sobretudo a parcela de risco). Principalmente porque a brucelose compromete a qualidade de vida e o rendimento laboral do indivíduo.

Palavras-chave: Saúde pública, epidemiologia, brucelose humana.

Summary: The current epidemiological knowledge regarding human brucellosis in Brazil is still scarce, which may represents a public health problem and compromise the life quality. The present work aimed to identify possibel epidemiological aspects associated with human brucellosis in Brazil, based on a dataset from the ‘Ministério da Saúde’ gethered from 2013 to 2017, obtained through the eletronic system ‘Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC)’. In order to evaluate the epidemiological aspects, data on prevalence of brucellosis was taking

into account, in which differences on this index were tested according to the sex of the individual (male, female), living area (urban, rural), laboral occupation (with risk of infection or no), age group (children, teenager, young, adult, aged), region of the country (North, South, Southeast, Center-West, Northeast) and year (2013–2017). Male individuals were more infected by *Brucella* than females as well as those inhabiting urban areas. This panorama may be related to the fact that most of these individuals exercise some work activity in rural areas (acquiring the infection), but live in cities. In this sense, the job of the individual may represent great risk of infection, mainly regarding those activities linked to livestock (cattle raising, slaughter houses, processing of products of animal origin), representing a zoonotic character. Individuals aged from 19 to 58 (youngs and adults) showed the highest prevalence values of brucellosis, which may also be related to work activities, since these people are in laboral age the probability of infection is favoured. The prevalences among the Brazilian political regions probably are related to livestock activities, in which the Center-West that has the biggest herds of livestock in the country, showed much higher prevalence of brucellosis when compared with other regions. The temporal analysis (from 2013 to 2017) showed inconstancy and inconsistency, reinforcing that the current diagnostic and notification system in Brazil are still flawed, which results in shallow epidemiological knowledge. Therefore, the epidemiological aspects of brucellosis must be linked to zoonotic issues and it is very important that diagnosis must be improved, as well as information regarding the disease should be better available to the population (mainly those individuals at risk). Mainly because the brucellosis compromises the live quality and work income of the individual.

Key words: Public health, epidemiology, human brucellosis.

6.1 Introdução

A brucelose se apresenta inicialmente como uma infecção aguda que meses depois, já em sua forma crônica, causa febre de origem indeterminada com diversas manifestações inespecíficas. Além da febre, podem ocorrer outros sintomas como hipersudorese, anorexia, astenia, fadiga, emagrecimento, depressão e artralgias. (Santiago et al., 2011). Os agentes etiológicos da brucelose são bactérias intracelulares facultativas que necessitam obrigatoriamente de um hospedeiro para sua sobrevivência, sendo que diferentes espécies de *Brucella* exibem preferências por hospedeiros e diferem quanto ao seu grau de patogenicidade (Hirsh e Zee, 2003).

No Brasil, não existem dados epidemiológicos acerca da brucelose humana, mesmo abrigando a maior população comercial de bovinos do mundo, o que é fator de risco para o aumento da prevalência da doença humana causada por *B. abortus* (Pappas, et al., 2006). E em relação à incidência da brucelose humana no Brasil, o número ainda é subestimado, pois o quadro clínico da doença é extremamente variável, por não ser declarada às autoridades sanitárias e por ser diagnosticada erroneamente por médicos. A verdadeira incidência pode

ser estimada em 10 a 25 vezes maior que o relatado (Nimri, 2003).

Segundo dados de 2011 publicados pelo Ministério da Saúde, o perfil de morbimortalidade dos trabalhadores brasileiros tem apresentado relação direta com a natureza das condições de trabalho e informações relativas ao ofício, fato que pode muitas vezes determinar se os trabalhadores se expõem ou não a riscos de infecções por doenças (Queiroz e Maciel, 2001). Devido à problemática apresentada anteriormente e, principalmente pelo fato da brucelose representar alto risco à saúde pública, o presente trabalho teve como objetivo analisar os dados do Ministério da Saúde referentes às informações da brucelose humana no Brasil, de 2013 a 2017, obtidos via sistema eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC), e assim identificar aspectos epidemiológicos da doença no país.

6.2 Materiais e Métodos:

A presente metanálise foi baseada nos dados do Ministério da Saúde (MS) entre os anos de 2013 e 2017, obtidos via sistema eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC), referentes às informações sobre brucelose humana, no Brasil. Foram avaliadas diferenças na prevalência da brucelose entre as variáveis de interesse que constavam nos dados do MS, e as quais foram definidas e escolhidas de acordo com estudos prévios, bem como objetivando avaliação do perfil da distribuição geográfica (por regiões do país) e temporal (de 2013 a 2017) da doença. As variáveis utilizadas foram relativas ao sexo dos indivíduos (masculino e feminino), a área de habitação (urbana ou rural), ocupação (se exerce atividade de risco à infecção por *Brucella* ou não), faixa etária (criança, adolescente, jovem, adulto, idoso), região do país (Norte, Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste) e ano (2013, 2014, 2015, 2016, 2017). As regiões Nordeste e Sudeste foram excluídas das análises estatísticas, pois apresentaram apenas 5 e 27 observações, respectivamente, durante todo o período estudado, sendo assim incipientes (IBGE, 2015). Dados nulos ou em branco, bem como diagnósticos inconclusivos, não foram incluídos nas análises.

Uma análise preliminar foi realizada para verificar se os dados referentes às variáveis seguiam uma curva normal de distribuição, através do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) (Zar, 2010). Para avaliar possíveis diferenças na prevalência de brucelose entre indivíduos do sexo masculino e feminino, habitantes em área urbana e rural e indivíduos que exercem ou não trabalho que representa risco de infecção à brucelose, foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM) de regressão logística e, em caso de significância estatística ($p < 0,05$), foi calculada a razão de chance do modelo (*odds ratio [OR]*) em que $0 < \text{OR} < 1$ indica relação

negativa entre as variáveis (fator de proteção), OR = 1 indica ausência de relação entre as variáveis e OR > 1 indica relação positiva entre as variáveis (fator de risco), além disso, o intervalo de confiança (95%) do modelo também foi estimado, sendo que se o valor 1 estiver incluído no intervalo o modelo é considerado nulo (Dohoo et al., 2003). As variáveis de referência em cada modelo foram sexo masculino, habitação em área rural e atividade de trabalho que exerce risco à infecção por *Brucella* spp.

Para avaliar diferenças na prevalência de brucelose entre faixas etárias dos indivíduos, regiões do país e ao longo dos cinco anos de observações, foi utilizada a análise de variância (*one way*-ANOVA) seguida por um pós-teste (*post-hoc*) de Tukey para múltiplas comparações, uma vez que os dados seguiram uma distribuição normal segundo o teste de K-S (Zar, 2010).

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R Development Core Team, 2008).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Panorama geral da brucelose humana no Brasil, suas relações com o sexo, área de habitação e atividade laboral dos indivíduos, segundo dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017

O banco de dados foi composto por 2.681 registros, dos quais 2.175 (81,1%) apresentaram diagnóstico conclusivo (seja positivo ou negativo). Este fato indica certa fragilidade na detecção deste agente infeccioso no Brasil, visto que aproximadamente 20% dos testes foram inconclusivos, sugerindo que melhorias devem ser implantadas nesse sentido.

Em relação ao sexo dos indivíduos, notou-se que ser do sexo masculino representou um fator de risco a brucelose (Tabela 1). Em estudo similar realizado em Portugal, onde foi verificado espondilodiscite brucélica e associada à brucelose, viu-se que a maioria das pessoas infectadas por *Brucella* (55,6%) foram do sexo masculino (Lebre et al., 2014).

Mesmo com essa porcentagem, não se pode afirmar que a brucelose tem predileção pelo sexo masculino, em função das atividades de exposição exercidas pelo homem, talvez, a ausência de um serviço específico de notificação para a brucelose possa mascarar a real incidência da doença e suas variáveis, (Buzgan et al., 2010). E ainda precisa se considerar a ideia de que os homens procuram menos os serviços de saúde, sendo assim os dados podem ser maiores.

Na China, a brucelose é de notificação compulsória, tanto em humanos quanto nos

animais, por meio do sistema de notificação chinês, e os casos notificado em humanos é de 162.329 no período de março a agosto de 2013 em todas as Unidades de Saúde da Família (USF) (Soares et al., 2015). Com uma prevalência de 41,1% em 1.201 de 2.922 municípios dos amostrado, nesse estudo foi observando-se um processo sazonal de picos de casos na primavera e verão, predominando o sexo masculino, e mais da metade dos casos tinha idade compreendida entre 30 e 49 anos (McDonald et al, 2006)

Tabela 1: Prevalência de brucelose de acordo com o sexo, área de habitação e atividade laboral, no Brasil, dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017, associadas aos coeficientes dos respectivos testes estatísticos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Variáveis	Grupos	Prevalência (%)	p	OR	IC
Sexo	Masculino	34,81	< 0,001	1,7	1,38–2,08
	Feminino	23,86			
Área de habitação	Urbana	33,71	0,007	0,77	0,64–0,93
	Rural	28,29			
Atividade laboral	Considerada de risco	94,50	< 0,001	3,73	2,16–6,43
	Não considerada de risco	82,15			

OR = *odds ratio* (razão de chance); IC = intervalo de confiança de 95%.

Com relação à área de habitação dos indivíduos, foi possível constatar que a prevalência de brucelose apresentou-se mais elevada em áreas urbanas (Tabela 1), fato que se contrapõe ao encontrado por Gonçalves et al. (2013) em um estudo realizado em Jataizinho, estado do Paraná. Todavia, estes mesmos autores postularam que o principal fator de risco à infecção por *Brucella* estaria ligado ao trabalho exercido em áreas rurais e não necessariamente ao fato do indivíduo simplesmente habitar a região. Sendo assim, é plausível a possibilidade de que habitantes das cidades, que exerçam alguma atividade laboral de risco, se infectem com maior frequência do que aqueles que vivem em áreas rurais muitos habitantes de áreas urbanas, sobretudo em regiões de intensa atividade pecuária, apresentam jornadas trabalhistas em áreas rurais, exercendo alguma atividade de risco a brucelose.

A transmissão ocorre entre humanos por contato direto ou indireto com animais infectados, anexos fetais ou abortos, bem como através da ingestão de produtos de origem animal contaminados, e manipulação de carcaças e vísceras durante abates sanitários (Sola et al., 2014).

A prevalência de brucelose também foi claramente maior no grupo de indivíduos que exercem alguma atividade laboral considerada de risco (Tabela 1), pois, é uma doença ocupacional, ocupando lugar de destaque, afetando geralmente grupos profissionais da área de pecuária, ou os que lidam com animais, principalmente os de produção leiteira. Porém, sabe-se que pode acometer, ainda, os funcionários que participam diretamente do abate de animais e que estão expostos ao sangue, carcaças e vísceras (Cardoso et al., 2011).

Os médicos veterinários estão sujeitos aos mesmos riscos, durante exercício das atividades de assistência às criações ou inspeção sanitária de produtos de origem animal nos abatedouros (Germano et al., 2003). Brucelose faz parte da lista de doenças infecciosas e parasitárias relacionadas ao trabalho, sendo classificada no Grupo I do Código Internacional de Doenças - CID 10 e mesmo em locais considerados livres de brucelose animal, podem ocorrer casos importados devido à circulação de pessoas de áreas endêmicas para as livres (Brasil, 1999).

Diversos estudos corroboram tais resultados, como por exemplo, Spinola et al. (2008) que encontraram 66,40% dos empregados de um frigorífico em Salvador, Bahia, infectados por *Brucella*, chamando a atenção para os setores de suínos que retiveram 33,33% dos infectados, os quais trabalhavam com manipulação de vísceras.

Este panorama não é notado somente no Brasil, mas outros países, sobretudo em desenvolvimento como mostra o estudo realizado por Franco et al. (2017) na República de Angola onde profissionais ligados à atividades pecuárias, de matadouros e açougues se apresentaram altamente infectados.

Segundo Franco et al. (2017), a maioria dos trabalhadores em setores e atividades de risco a infecção por *Brucella*, não utilizam medidas de biossegurança (e.g. consomem leite e produtos lácteos não pasteurizados no local), expressando falta de conhecimento sobre a brucelose e sugerindo necessidade em aumentar o nível de entendimento desses profissionais, especialmente para os criadores e profissionais. É essencial, em termos de saúde pública e em termos individuais, que os profissionais tenham conhecimentos sobre brucelose animal e as respectivas medidas de prevenção (Franco et al., 2017).

Se tratando de brucelose, ainda é preciso repensar as políticas públicas voltadas para a parcela da população acometida pela doença, não somente pelas manifestações agudas, mas principalmente pelo efeito pós infecção, pois as consequências da doença permanecem e alteram a qualidade de vida e o rendimento laboral dos indivíduos (Lima et al., 2010). Mesmo que já se conheça os fatores que contribuem para o desenvolvimento das doenças do trabalho, a reabilitação de trabalhadores é um dos maiores desafios contemporâneos para o campo da

saúde pública no Brasil (Lima et al., 2010).

6.3.2 Prevalência de brucelose de acordo com as faixas etárias no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017

A prevalência de brucelose, segundo o banco de dados analisado, foi menor em crianças (0 a 11 anos), sendo estatisticamente diferente de todas as outras faixas etárias ($p < 0,001$; $F_{4,2179} = 19,747$), exceto adolescentes (12 a 18 anos) ($p = 0,91$; $F_{4,2179} = 19,747$) os quais apresentaram prevalência de brucelose ligeiramente maior que crianças (Figura 3). Jovens (19 a 29 anos), adultos (30 a 59 anos) e idosos (acima de 60 anos) apresentaram as maiores prevalências de brucelose, sendo que jovens e adultos exibiram praticamente o mesmo valor, e idosos um valor mais baixo (Figura 3). Todavia, a prevalência de brucelose entre jovens, adultos e idosos não diferiu estatisticamente ($0,055 < p < 0,995$; $F_{4,2179} = 19,747$).

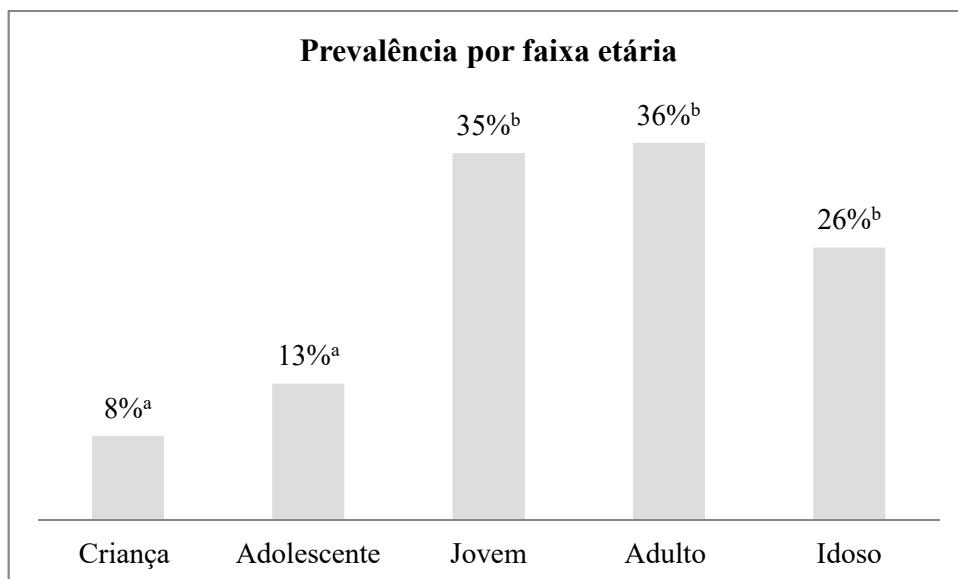


Figura 3. Prevalência de brucelose em humanos por faixas etárias no Brasil, segundo dados do e-SIC de 2013 a 2017. Letras iguais representam valores de prevalência estatisticamente iguais (nível de significância de $p < 0,05$) (0 a 11 anos: criança; 12 a 18: adolescente; 19 a 29: jovem; 31 a 59: adulto, 60 em diante: idoso).

No geral, foi possível perceber o ápice da prevalência de brucelose em indivíduos jovens e adultos, sendo que de maneira similar, outros estudos sugerem uma maior prevalência de brucelose concentrada em indivíduos na faixa etária de 20 a 29 anos (Franco et al., 2012) ou 20 a 64 anos com idade média de 41,8 (Soares et al., 2015). Tal tendência pode estar relacionada principalmente ao fato de que esta faixa de idade (jovens e adultos) compreende

indivíduos mais ativos e em tempo laboral, o qual pode ser uma atividade que representa risco de infecção, como discutido anteriormente. Nesse sentido, Spinola et al. (2008) registraram 81,59% dos empregados de um frigorífico com sorologia positiva para brucelose, sendo estes com idade entre 20 e 40 anos.

Outra possibilidade que também pode estar ligada a esses resultados é o fato de que jovem e adulto compreende a maior parte da vida, aumentando a probabilidade de infecção por maior tempo de exposição ao patógeno, quando comparado com crianças e adolescentes.

Por fim, em idosos a prevalência de brucelose sofre um leve declínio, fato que pode estar relacionado com a taxa de mortalidade de indivíduos infectados e redução na expectativa de vida, por complicações decorrentes da doença e da própria idade avançada.

6.3.3 Prevalência de brucelose nas regiões do Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017

Dentre as regiões do Brasil, o Centro-Oeste apresentou maior prevalência de brucelose (77,1%), seguido pelo Sudeste (44,4%), Sul (27,2%), Norte (23,5%) e por último Nordeste (20,0%) (Figura 4). As regiões Sudeste e Nordeste não foram incluídas nas análises estatísticas, pois apresentaram baixa amostragem (apenas 27 e 5 registros, respectivamente). Quando comparadas, apenas a prevalência de brucelose na região Centro Oeste foi estatisticamente diferente das outras regiões ($p < 0,03$; $F_{4,2103} = 59,706$). Todavia e de maneira geral, os resultados encontrados estão correlacionados com a distribuição dos rebanhos e atividade pecuária no Brasil, em que a região Centro-Oeste apresenta o maior rebanho de gado de corte do país, o Sudeste o maior rebanho de gado de leite e a região Sul o maior rebanho suíno (EMBRAPA PANTANAL, 2018).

Segundo alguns estudos chamam a atenção o fato de o Brasil ser um país que reconhece a brucelose animal como importante zoonose e, no entanto, ignorar a infecção em seres humanos, pois além da doença estar evidenciada em vários rebanhos do país, o Brasil se situa bem próximo de países considerados endêmicos, como exemplo, o Peru e a Argentina (Pappas et al., 2006; Lawinsky et al., 2010), evidências as quais corroboram os resultados obtidos no presente trabalho.

Os resultados anteriores demonstram uma situação alarmante, principalmente porque em várias partes do mundo a brucelose humana é considerada uma doença comum há décadas, e estes países já enfrentam desafios para erradicá-la, enquanto no Brasil a epidemiologia da doença é pouco conhecida e apresenta dados escassos (Soares et al., 2015). Além disso, a prevalência real da brucelose humana no Brasil é subestimada devido ao

quadro clínico da doença ser extremamente variável, por não ser declarada às autoridades sanitárias e por ser diagnosticada erroneamente por médicos. Assim sendo, a verdadeira prevalência pode ser estimada em 10 a 25 vezes maiores que o relatado (Nimri, 2003).

Cabe ainda destacar que no Brasil, de acordo com Sistema de Informações Hospitalares do SUS - SIH/SUS do Ministério da Saúde, de janeiro de 2008 a abril 2011 houve 108 internações em decorrência de brucelose no âmbito do SUS, sendo 13 na Região Norte, na Região Nordeste 17, na Região Sudeste 34, 38 na Região Sul e 6 na Região Centro-Oeste. A média de dias de internação por brucelose no país durante aquele período foi de 9,5 dias. Com relação ao número de óbitos ocorridos neste mesmo período, foram registrados 1 óbito na Região Nordeste, 1 na Região Sudeste e 2 na Região Sul. (Brasil, 2011). Fato que reforça a importância de um conhecimento sólido acerca da epidemiologia da brucelose no Brasil, bem como demonstra o atual conhecimento lacunar e difuso acerca do tema.

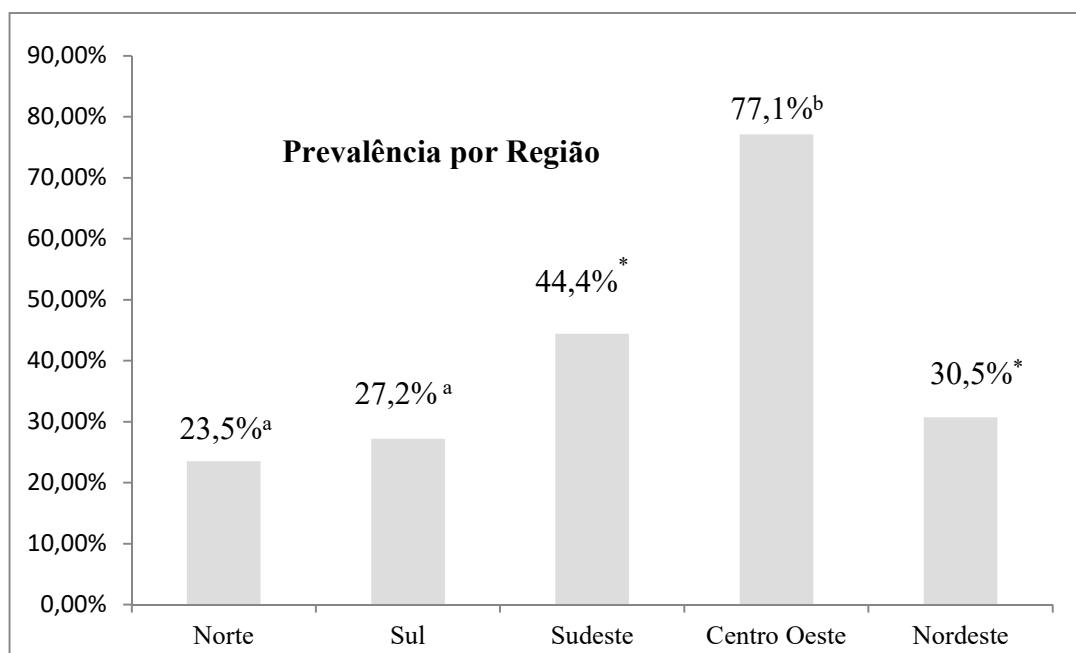


Figura 4. Prevalência da brucelose em humanos de acordo com as regiões do Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2013 a 2017. Letras iguais representam valores de prevalência estatisticamente iguais (nível de significância de $p < 0,05$), asterisco (*) indica valores não considerados nas análises estatísticas devido à baixa amostragem.

6.3.4 Panorama geral da prevalência de brucelose humana de 2013 a 2017 no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde

A brucelose ainda é um problema global de saúde pública, com aproximadamente 500.000 novos casos de infecção humana a cada ano, considerando todas as espécies de

Brucella, embora a maioria dos países já o controla (Nielsen e Yu, 2010). Os resultados do presente estudo demonstraram um acentuado crescimento na prevalência de brucelose humana do Brasil de 2013 a 2015, sendo que as diferenças nesses números foram estatisticamente diferentes (Figura 5). No ano de 2016 houve uma ligeira queda neste índice, o qual diferiu estatisticamente de todos os outros anos e em 2017 a prevalência voltou a crescer atingindo um valor equivalente aquele observado em 2015 (Figura 5). A única explicação plausível para este padrão está relacionada ao fato de que 2013 e 2014 apresentaram apenas 66 e 137 observações, respectivamente, em comparação aos anos de 2015 ($n = 557$), 2016 ($n = 804$) e 2017 ($n = 607$). Sendo assim, quanto mais abrangente for a amostragem, maior será a probabilidade de que uma pessoa infectada seja detectada. Além disso, em um país tão extenso e populoso como o Brasil é de suma importância que as amostragens sejam anualmente, e em longo prazo, amplas a fim de se observar os verdadeiros padrões temporais da doença.

Ainda que a brucelose seja uma doença reconhecida mundialmente como potente infecção em humanos e animais, no Brasil esta não representa um agravo de notificação compulsória e o país não possui uma rede organizada de saúde pública capaz de identificar casos humanos (Lawinsky et al., 2010; Ministério da Saúde, 2010). Mesmo assim, em casos isolados surtos da doença deveriam ser notificados, investigados e medidas de controle adotadas (Ministério da Saúde, 2010). Tais fatos certamente comprometem a verdadeira estimativa anual da doença no país. Nesse sentido, é pertinente destacar os dados apresentados por Soares et al. (2015) referentes ao município de Marechal Deodoro, no estado de Alagoas, onde foi constatada prevalência de brucelose humana de 4,4% e, segundo os autores, a doença era absolutamente desconhecida na região, não havia qualquer dado ou nota técnica para os profissionais de saúde sobre o tema e, consequentemente, nenhum registro no sistema de informação de agravos de notificação (SINAN). Por fim, a população que procurava o serviço de saúde não foi orientada adequadamente.

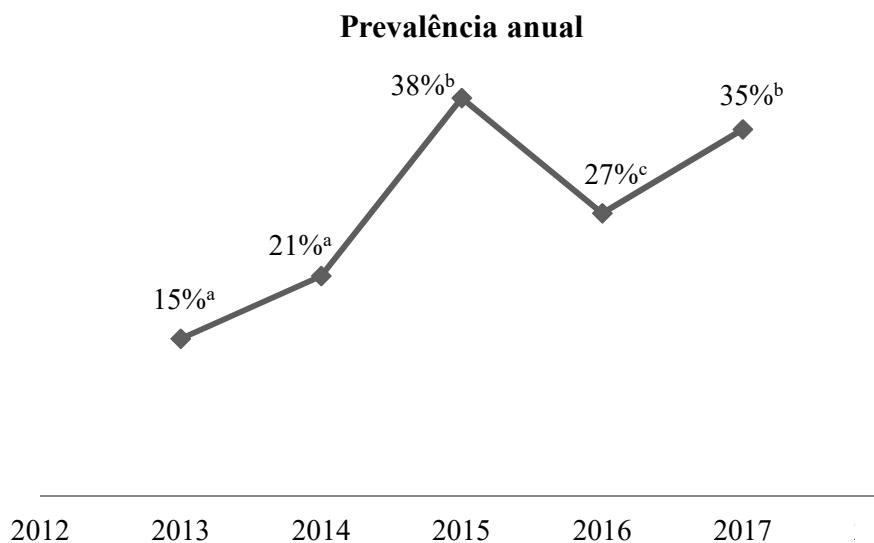


Figura 5. Prevalência da brucelose em humanos no Brasil no período de 2013 a 2017, segundo dados do Ministério da Saúde. Letras iguais representam valores de prevalência estatisticamente iguais (nível de significância de $p < 0,05$).

6.4 Conclusão:

A presente abordagem destaca a importância de se estudar a brucelose em humanos, e o quanto este conhecimento precisa ser aprofundado e o tema esclarecido para a população, não somente para os grupos de risco, mas também para todos os segmentos da sociedade. Os resultados também mostraram claramente que a problemática da brucelose no Brasil não deve ser tratada isoladamente aos rebanhos do país e suas divisões fronteiriças, vista a importância que estes rebanhos possuem e o potencial risco que algumas fronteiras representam para entrada do patógeno no território nacional. Acredita-se que ainda existam inúmeras perguntas que devam ser respondidas sobre a brucelose e seus aspectos epidemiológicos. Este trabalho serve, sobretudo, para retomar um assunto que se refere à saúde pública e que de forma geral não tem sido foco das autoridades competentes. Por fim, sugere-se que os métodos de diagnóstico sejam melhorados preconizados, eficientes e enfatizados de forma a preservar a qualidade de vida da população de risco.

6.5 Referências

Azevedo, S., Batista, S., Alves, C.S.A., Clementino, C.J, I. J. 2003. Ocorrência de anticorpos contra *Brucella abortus* em cães errantes da cidade de Patos, Estado da

Paraíba, Brasil. v. 70, n. 4, p. 499-500.

Bezerra, R. A., Mendonça, C. E. D., Sicupira, P.M.L; Munhoz, A.D., Ribeiro, A. R. P., Carlos, R.S.A., Rêgo, G. 2012. Prevalência de anticorpos contra *Brucella canis* em cães na região de Ilhéus-Itabuna. BA, Brasil. Revis Brasileira de Medicina Veterinária, v.34, n.1, p.27-30.

Buzgan, T., Karahocagil, MK., Irmak, H., Baran, AI., Karsen, H., 2010. Evirgen, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. Int J Infect Dis. doi:10.1016/j.ijid.2009.06.031.

Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H. 2003. Veterinary epidemiologic research. AVC Inc., Charlottetown.

Embrapa Pantanal, 2018. Brucelose traz riscos à saúde humana e prejuízos à fazenda.

Franco, C. M., Fernando, B., Carla,. 2017. Prevalence and factors associated with human brucellosis in livestock professionals. Rev Saude Pública 51:57. doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006051.

Gonçalves, D.D., Benítez, A., Fabiana, M.R.L.M., Alves, L. A., Freire, R.L., Navarro, I.T., Santana, M.A.Z., Santos, L.R.A.T., Vieira, M.L., Freitas, J.C., 2013: Zoonoses em humanos de pequenas propriedades rurais em Jataizinho, Paraná, Brasil. Revis Brasileira de Microbiologia. doi.org/10.1590/S1517-83822013005000011.

Hirsh, D., Zee, C., Y. 2003: Microbiologia Veterinária. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 464p.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. 2015. Estatísticas do Registro Civil, v.42, Rio de Janeiro - Brasil.

Keid, L.B., 2001. Diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis*. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais, São Paulo, SP, Brasil. 96p.

Lawinsky, M.L.J., Ohara, P.M., Elkhoury, M.R., Faria, N.C., Cavalcante, K.R.L.J. 2010. Estado da arte da brucelose em humanos. Rev Pan-Amaz Saúde.v, 3, 75-84.

Lebre, A., Velez, J., Seixas, D. Rabadão, J. Oliveira, Cunha, J., Silvestre, M., 2014. Espondilodiscite Brucélica: Casuística dos Últimos 25 Anos. Serviço de Doenças Infecciosas Coimbra. Portugal.

Lima, M.A.G., Andrade, A.G.M., Bulcão, C.M.A., Mota, E.M.C.L., Magalhaes, F.B., Carvalho, R.C.P., Freitas, S.M.C., Sá, S.R.F.C., Porto, L.A., Neves, R.F. 2010. Programa de reabilitação de trabalhadores com LER/DORT do Cesat/Bahia: ativador de mudanças na Saúde do Trabalhador. Revis brasileira de Saúde ocupacional, São Paulo, v.35, n.121, p. 112-121. doi.org/10.1590/S0303-76572010000100012.

Megid, J., Salgado, Keid, V.R., Siqueira, L.B., Meirelles, A.K., Moretti, C.E., D.M. 2007. Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n. 6, p. 1583-1585. doi.org/10.1590/S0102-09352007000600036.

Ministério da Saúde. 2010. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Brasília.

McDonald, W.L., Jamaludin, R., Mackereth ,G., Hansen, M., Humphrey, S., Short, P., et al. 2006. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. J Clin Micro. 4363-70. doi 10.1128/JCM.00680-06.

Nielsen, K., Yu,W.L., 2010. Diagnóstico sorológico de brucelose. Contribuições, Sec Biol Med Sci .; 31 (1): 65-89.

Ninri, L. 2003. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR. BMC Infectious Disease, p.1-7. doi 10.1186/1471-2334-3-5.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L, & Tsianos, E.V. 2006. The new global map of human brucellosis. The Lancet Infectious Diseases. fev. v. 6, i. 2, p. 91-99. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6).

R Development Core Team., 2008. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.

Santiago, T., Rovisco, J., Silva, J., Silva, J.A, 2011. Brucelose um retrato osteoarticular últimos 10 anos. Órgão sociedade portuguesa de reumatologia port.;36:120-125

Soares, C.P.O.C., Silva, F.F., Teles, J.Á.A., Santos, A.F., Silva, S.O.F., Cruz, M.V.R.A. 2015. Prevalência de *Brucelose* ssp em Humanos. Revis. Latino-Americana. Enfermagem. 919-26. doi 10.1590/0104-1169.0350.2632.

Zar JH., 2010. Biostatistical analysis, 5th edn. Prentice Hall, New Jersey.

7. Considerações Finais:

Com a realização desta pesquisa foi possível compreender um pouco mais a dimensão da brucelose em humanos, e que isso precisa ser melhor esclarecido a toda a população brasileira, bem como ser reavaliado nossas condições de diagnóstico, pensando na morbidade que a doença traz e em sua pouca percepção por todos de modo geral, com as análises laboratoriais e sequenciamento do DNA da agente etiológico da brucelose e portanto, sugerimos aos médicos que considerem a pesquisa de *Brucella* spp. como possíveis precursores de doenças reumatológicas.

8. Anexo: Anamnese contendo informações clínicas recebidas, junto com as amostras de sangue e soro de cada indivíduo usado nesta pesquisa. (A as amostras 22 e 40 foram excluídas pela falta de correspondência entre soro e sangue).

- 001: Masculino, 61 anos, refere convívio em área rural e de mata, queixa clínica principal ósteo-muscular.
- 002: Feminino, 59 anos, refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular acompanhada de quadro depressivo.
- 003: Feminino, 22 anos, refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular.
- 004: Masculino, 29 anos, exerce atividade profissional em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular.
- 005: Feminino, 41 anos, queixa clínica principal ósteo-muscular e neurológica acompanhada de quadro depressivo.
- 006: Feminino, 58 anos, refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular
- 007: Masculino, 57 anos, refere convívio em área de mata, queixa clínica principal ósteo-muscular.
- 008: Feminino, 41 anos, queixa clínica principal neurológica e ósteo-muscular compatível com poliradiculoneuropatia periférica e miosite.
- 009: Feminino, 45 anos, queixa clínica principal cutâneo-mucosa. Evoluiu com condrite nasal e perfuração do septo. Apresenta recidivas da condrite nasal, cuja biópsia mostrou processo inflamatório crônico. Fez uso de ceftriaxona com remissão do quadro clínico. Dois anos após apresentou recidiva com melhora somente com uso de Doxiciclina 100mg 12/12 horas.
- 010: Feminino, 47 anos, apresentou eritema cerca de 60 dias antes da coleta, queixa clínica principal ósteo-muscular, neurológica e distúrbios do cognitivo.
- 011: Masculino, 49 anos, manifestações neurológicas e ósteo-muscular, com sorologia positiva para borreliose e submetido a tratamento com ceftriaxona e doxiciclina com melhora do quadro. Retorna com queixa clínica principal neurológica, ósteo-muscular e distúrbios do cognitivo

- 012: Feminino, 18 anos. Apresentou eritema migratório localizado em membro inferior direito cerca de três meses antes da coleta de sangue para realização dos exames. Relata cefaleia, fadiga crônica, edema em mãos e pés, artralgia em mãos e artrite em pés.
- 013: Feminino, 76 anos, convívio em zona rural, apresentou eritema migratório cerca de 25 dias antes da coleta, queixa clínica principal ósteomuscular.
- 014: Feminino, 40 anos, convive em área rural queixa clínica principal ósteo-muscular. Relata mialgia, cefaleia, artralgia e artrite em mãos e joelhos.
- 015: Feminino, 32 anos, refere convívio em área rural queixa clínica principal cutânea e ósteo-muscular. Lesão na face direita de início a quatro anos, de características hiperemias, evoluindo com expansão e atrofia. Tratamento com ceftriaxona por 30 dias seguido de doxiciclina por 90 dias.
- 016: Feminino, 39 anos, queixa clínica principal ósteo-muscular, neurológica e distúrbios psiquiátricos. Tratamento com doxiciclina por 60 dias com melhora do quadro.
- 017: Feminino, 49 anos, por conta da atividade profissional refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular.
- 018: Feminino, 44 anos, queixa clínica principal neurológica, ósteo-muscular e distúrbios do cognitivo.
- 019: Feminino, 57 anos, exposto por conta da atividade profissional, queixa clínica principal ósteo-muscular com artrite e deformação articular em articulação interfalângicas.
- 020: Feminino, 43 anos, queixa clínica principal neurológica compatível com poliradiculoneuropatia periférica e miosite. Desenvolveu quadro de autoimunidade pós-infecção
- 021: Feminino, 36 anos, queixa clínica principal ósteo-muscular, neurológica e distúrbios do cognitivo. Tratamento com doxiciclina por 60 dias.
- 023: Masculino, 43 anos, queixa clínica principal ósteo-muscular.
- 024: Masculino, 18 anos, convívio em área rural, queixa clínica principal ósteomuscular, distúrbio psiquiátricos e cognitivos.
- 025: Masculino, 34 anos, Refere convívio em área rural por conta da atividade profissional. Queixa clínica principal ósteo-muscular.
- 026: Feminino, 42 anos, queixa clínica principal neurológica e ósteo-muscular.
- 027: Feminino, 32 anos, Exerce atividade profissional em área rural, queixa clínica principal cutânea e ósteo-muscular. Lesão na face direita de início a quatro anos, de

características hiperemidas, evoluindo com expansão e atrofia. Tratamento com ceftriaxona por 30 dias seguidos de doxiciclina por 90 dias. Melhora da lesão.

• 028: Feminino, 39 anos, queixa clínica principal ósteo-muscular, neurológica e distúrbios psiquiátricos. Tratamento com doxiciclina por 60 dias com melhora do quadro.

• 029: Feminino, 44 anos, queixa clínica principal neurológica, ósteo-muscular e distúrbios do cognitivo.

• 030: Masculino, 42 anos, queixa clínica principal ósteo-muscular.

• 031: Feminino, 51 anos queixa clínica principal ósteo-muscular.

• 032: Feminino, 47 anos, queixa clínica principal cutaneomucosa. Fez uso de ceftriaxona com remissão do quadro clínico. Dois anos após apresentou recidiva com melhora somente com uso de Doxiciclina.

• 033: Feminino, 47 anos, Exerce atividade profissional em área rural, com formação de eritema, queixa clínica principal ósteo-muscular.

• 034: Feminino, 59 anos, refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteomuscular acompanhada de quadro depressivo.

• 035: Feminino, 44 anos, refere que teve diagnóstico de Doença de Lyme nos Estados Unidos em 2013 sendo tratada com 21 dias de antibiótico e melhora do quadro. Queixa clínica principal distúrbios do cognitivo.

• 036: Masculino, 42 anos, Relata febre, mialgia e artralgia. Fez uso de Doxiciclina 100mg 12/12 horas.

• 037: Feminino, 33 anos, por conta da atividade profissional, queixa clínica principal ósteo-muscular e distúrbios do cognitivo.

• 038: Masculino, 50 anos Relata febre, mialgia, artralgia e fadiga. Nega lesão de pele. Sinais de neurite periférica com queixa de parestesia e dificuldade de marcha. Artralgia e artrite metacarpofalangeana.