

## ISOLAMENTO DE *Brucella* sp EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL E SIGNIFICADO EM SAÚDE PÚBLICA<sup>1</sup>

José de Arimatéa FREITAS<sup>2</sup>  
Eváldson Joaquim Corrêa dos SANTOS<sup>3</sup>  
Jefferson Pinto de OLIVEIRA<sup>4</sup>

**RESUMO:** Com o objetivo de detectar a presença de *Brucella* sp em produtos de origem animal expostos ao consumo, 29 amostras de derivados do leite e carne, entre os quais alguns de origem desconhecida, foram submetidas ao diagnóstico biológico em cobaia e isolamento em meios de cultura, conforme metodologias rotineiras recomendadas. Onze cepas de *Brucella* sp foram isoladas nos produtos analisados, sendo três em queijo do tipo prato, três em queijo de coalhada crua, três em queijo de coalhada cozida e duas em linguiça do tipo frescal. Esses resultados representam um risco potencial para a saúde pública e demandam maior rigor na vigilância sanitária de produtos expostos ao consumo.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** *Brucella* sp, Brucelose, Produtos de Origem Animal, Vigilância Sanitária de Alimentos

## SURVEY OF *Brucella* sp IN PRODUCTS OF ANIMAL ORIGIN AND HEALTH CONCERN

**ABSTRACT:** With the objective to determine *Brucella* sp in products of animal origin, 29 samples of foods from dairy and meat products of unknown origin were submitted to biologic diagnosis in cavies and isolation in bacteriological medium according recommended methodology. *Brucella* sp was isolated in 11 samples from the products. These results represent a potential risk to the public health and demand more rigidity in the sanitary surveillance of foods to consumption.

**INDEX TERMS:** *Brucella* sp, Brucellosis, Products of Animal Origin, Sanitary Surveillance of Foods

<sup>1</sup> Aprovado para publicação em 16.10.2002

Trabalho desenvolvido como parte de projeto de pesquisa cadastrado na Unidade de Apoio à Pesquisa e Pós-graduação da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará e com apoio do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Dr., Professor Adjunto, da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará – FCAP

<sup>3</sup> Médico Veterinário, Ex-Bolsista do PIBIC/CNPq, Secretaria de Estado de Agricultura do Pará – SAGRI

<sup>4</sup> Médico Veterinário, Professor Substituto da FCAP, Mestrando em Ciência Animal/UFPa.



## 1 INTRODUÇÃO

A brucelose continua sendo uma das mais importantes doenças prevalentes, e desde a descoberta da *Brucella melitensis*, em 1887, permanece como importante doença dos animais domésticos e grave zoonose em várias regiões do mundo (YOUNG, 1995; CORBEL, 1997).

Na ocorrência da brucelose zoonótica, além do contato direto do homem com os animais e seus produtos de abortos, destacam-se como uma das mais importantes fontes de contágio os alimentos de origem animal crus, mal cozidos ou não pasteurizados, considerando-se, então, a ingestão de alimentos um fator de risco (MALIK, 1997; SHIMSHONY, 1997).

A esse respeito, Giorgi, Fernandez e Caldas (1963) detectaram *Brucella suis* em linguiças frescas, Abrantes Filho (1964) informou a ocorrência de brucelas vivas em amostras de queijo minas frescal e Corrêa e Corrêa (1992), com base em numerosas citações de outros autores, informaram sobre a viabilidade de brucelas em diversos tipos de derivados do leite. Por outro lado, Lerche e Entel (1960) identificaram a presença de brucelas na musculatura, sangue, órgãos e leite de bovinos reagentes sorológicos positivos à brucelose, Redaelli (1965), no leite e órgãos de bovinos também reagentes positivos à doença, Robertson et al (1971), em rebanhos de corte e Langenegger et al (1975), em exudatos de bursites observadas em animais abatidos para consumo humano.

Recentemente, Malik (1997) associou a ingestão de leite e fígado crus à ocorrência de 104 casos de brucelose humana em região de pastoreio da Arábia Saudita, e Langoni et al (2000) isolaram *Brucella abortus* em amostras de leite. No Estado do Pará, pouco se conhece a respeito de fontes de infecção de brucelose humana representadas por produtos de origem animal, embora Freitas et al (2000) tenham observado a infecção brucélica em bovinos e bubalinos abatidos para consumo humano, provenientes de mais de 27 municípios do Estado do Pará e identificado sorologicamente a mesma nos animais abatidos.

O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de brucelas viáveis em produtos de origem animal expostos ao consumo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de derivados do leite, entre os quais queijo dos tipos prato, coalhada crua, coalhada cozida de origem desconhecida, ricota, iogurte natural, creme de leite, manteiga, leite pasteurizado e de derivados da carne, como linguiça frescal, linguiça defumada e carne salgada (carne-de-sol), expostos à venda em feiras livre, locais de preparo e obtenção e supermercados, nas cidades de Belém, Marituba e Castanhal, totalizando 29 amostras, foram coletadas nos respectivos locais e submetidas à análise microbiológica visando detectar a presença de brucelas viáveis nos mesmos.



As amostras dos produtos foram submetidas ao isolamento do organismo em coxaia e meio de cultura contendo antibióticos e violeta de genciana, conforme metodologias e técnicas recomendadas por Giorgi, Fernandes e Caldas, (1963), Alton e Jones (1969) e World Health Organization (1986).

## 2.1 PREPARAÇÃO DE INÓCULOS

Na preparação de inóculos para serem inoculados em cobaias e semeados em meios de cultura, fragmentos dos produtos sólidos foram cortados com tesoura e pinça estéreis, de modo asséptico e triturados em *gral* com pistilo e areia estéril, a seguir homogeneizados com água destilada ou salina fisiológica estéreis.

Produtos embutidos foram, primeiramente, liberados de envoltório e colhidos fragmentos de porção interna. Produtos como queijo foram, inicialmente, liberados de embalagem, quando presente, e retiradas porções internas. No caso de carne-de-sol, foi flambada a porção externa e retirados fragmentos internos.

Em todos os casos foram empregados na preparação dos inóculos cerca de 1 g dos produtos; para produtos líquidos ou pastosos foram preparadas suspensões com cerca de 1 mL das amostras em água destilada ou salina fisiológica estéreis contendo antibióticos, Vancomicina (20 mg/L), Anfotericina B (Fungizone, 1 mg/L) e o antimicrobiano violeta de genciana (1/100 000).

## 2.2 INOCULAÇÃO EM COBAIA

Na passagem do organismo em coxaia empregaram-se animais jovens e de ambos os sexos, nos quais foram inoculados de 0,5 mL a 1,0 mL de inóculo, por via subcutânea na face interna da coxa e via intraperitoneal, com os cuidados de tricotomia e assepsia dos locais de inoculação. Na maioria das inoculações foram empregados dois animais para cada inóculo, reservando-se um animal como testemunha, sendo os animais, devidamente identificados, mantidos em gaiola com água e ração à vontade.

Os animais foram observados diariamente por um período de 40 dias, ao término do qual eram sacrificados e necropsiados e, se morressem durante o período, necropsiados, para observação de lesões em órgãos internos, colheita de exudatos inflamatórios e sangue, a serem empregados no diagnóstico sorológico, e aqueles, na recuperação de cepa do organismo em meio de cultura.

## 2.3 SOROLOGIA DE ISOLADOS DE COBAIA

Os materiais colhidos em cobaias inoculadas: exudato inflamatório e soro foram submetidos à sorologia pelo “card test” e soroaglutinação rápida (SAR) para confirmação sorológica da cepa isolada, conforme procedimentos recomendados para sorologia de *Brucella*.



## 2.4 SEMEADURA EM MEIO DE CULTURA

As cepas obtidas na passagem em cobaia, após a confirmação sorológica, foram submetidas à recuperação em meios de cultura contendo os antibióticos já referidos e a violeta de genciana. Como meios de cultura foram empregados o agar cérebro-coração e o caldo cérebro-coração, o primeiro em tubos e placas e o segundo em meio bifásico contendo como meio sólido o agar cérebro-coração. Os materiais semeados foram incubados a 37 °C em aerobiose e anaerobiose, neste caso com adaptação para atmosfera de CO<sub>2</sub> até o aparecimento de colônias características do organismo. Amostras dos produtos foram, também, semeadas nos meios de cultura mencionados, empregando-se inóculos preparados conforme mencionado anteriormente.

A recuperação em meio de cultura das cepas obtidas na passagem em cobaia, assim como o isolamento nos meios de cultura mencionados foram tentados várias vezes, até que a adaptação do crescimento sob atmosfera de CO<sub>2</sub> permitiu o crescimento do organismo nos meios de cultura.

As tentativas de isolamento nos meios de cultura, a passagem em cobaia e a recuperação de cepas nos meios de cultura foram acompanhadas pela bacterioscopia de esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada por Stamp (ALTON; JONES, 1969).

## 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na Tabela 1. Cepas de *Brucella* sp foram isoladas em 11 amostras dos produtos analisados, entre os quais linguiça frescal, queijo prato, queijo de coalhada crua e queijo de coalha cozida.

Segundo os dados da Tabela 1, das duas cepas de *Brucella* sp isoladas em queijo prato, apenas uma foi recuperada em meio de cultura, e das cepas do organismo isoladas em queijo de coalhada crua e queijo de coalha cozida nenhuma foi recuperada em meio de cultura.

Ainda segundo os dados da Tabela 1, em seis amostras de produtos: duas de queijo prato, duas de queijo de coalhada crua e duas de queijo de coalhada cozida semeadas em meio de cultura, apenas cinco cepas do organismo foram isoladas.

Cocos em cadeia, coco-bacilos isolados e numerosos coco-bacilos, corados em vermelho, foram observados nos esfregaços dos materiais coletados em cobaias inoculadas e de cepas isoladas em meio de cultura.

As cepas de *Brucella* sp isoladas nas amostras dos produtos analisados através de inoculação em cobaia demonstraram resultado na confirmação sorológica pelo "card test" e SAR. As cepas de *Brucella* sp isoladas nas amostras dos produtos analisados através de semeadura nos meios de cultura empregados, do mesmo modo, reagiram sorologicamente com soro positivo para brucela em lâmina (microaglutinação em placa).

Tabela 1 – Isolamento de *Brucella* sp em amostras de produtos de origem animal expostos ao consumo nas cidades de Belém, Marituba e Castanhal, no Estado do Pará, segundo o tipo de produto e os meios empregados no isolamento. Belém, 2002.

Tipo de produto	Número de amostras	Cepas isoladas em cabaia		Cepas isoladas em cabaia e recuperadas em meio de cultura		Cepas isoladas em meio de cultura	
		Amostras inoculadas	Cepas isoladas	Cepas inoculadas	Cepas recuperadas	Amostras inoculadas	Cepas isoladas
Linguiça frescal	8	8	2*	–	–	–	–
Linguiça defumada	1	1	–	–	–	–	–
Queijo prato	2	2	2	2	1	2	1
Queijo ricota	1	1	–	–	–	–	–
Iogurte natural	1	1	–	–	–	–	–
Leite pasteurizado	3	3	–	–	–	–	–
Creme de leite	1	1	–	–	–	–	–
Manteiga	1	1	–	–	–	–	–
Queijo de coalhada crua	6	4	1	1	–	2	2
Queijo de coalhada cozida	3	1	1	1	–	2	2
Carne-de-sol	1	1	–	–	–	–	–
Queijo minas frescal	1	1	–	–	–	–	–
Total	29	29	6	4	1	6	5

Nota: convenção adotada:

\* Cepas perdidas durante a conservação

\_ Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento



As cepas isoladas ainda não foram identificadas conclusivamente, embora as características de crescimento em microaerofilia apontem a espécie *B. abortus*.

#### 4 DISCUSSÃO

O isolamento de *Brucella sp* nos produtos analisados (Tabela 1) reafirma o significado que estes organismos continuam tendo na saúde coletiva, em decorrência do risco potencial representado pela ingestão de produtos crus, frescos ou mal cozidos e a ocorrência de doença humana, aliás, associação identificada por Canales et al (1993) em surto ocorrido no México, Malik (1997) em 104 casos ocorridos na Arábia Saudita e Al-Eissa et al (1990) em 102 casos da doença em crianças, respectivamente, com a ingestão de lácteos crus, fígado e leite crus e leite não pasteurizado.

Assim, brucelas viáveis foram também isoladas no leite de bovinos reagentes sorológicos positivos (LERCHE; ENTEL, 1960; LANGONI et al, 2000), linguiça frescal (GIORGI; FERNANDES; CALDAS, 1963) e queijo do tipo frescal (ABRANTES FILHO, 1964; ROJAS VENTURO; TELLO CONTRERAS, 1993), pastéis de queijo, leite e ou queijo de cabra não-pasteurizados (Anônimo, 1995). *Brucella sp* foi também isolada em produtos de origem animal nos Estados Unidos por Fox e Kauffman (1977) e na musculatura de bovinos reagentes positivos sorologicamente (LERCHE; ENTEL, 1960).

De acordo com os dados da Tabela 1, com exceção das amostras de leite pasteurizado, os demais produtos analisados

eram de origem desconhecida, produzidos artesanalmente, crus ou insuficientemente cozidos, condições que caracterizam elevado risco de contaminação humana com a ingestão dos mesmos, condições de risco também observadas por Alves et al (2001) e Ponsano et al (2001), na identificação sorológica do organismo em leite cru exposto ao consumo, respectivamente, na Paraíba e em Araçatuba, Estado de São Paulo e no isolamento de *B. melitensis* no sangue de pacientes de casos da doença associados à ingestão de leite e derivados não-pasteurizados (AL-EISSA et al, 1990; BRUCELLOSIS..., 1995).

Derivados do leite foram também apontados como fontes potenciais de contaminação humana, nos casos da doença ocorridos na França em 1996 (FRANCE, 1999). Queijo mexicano, queijo branco frescal e queijo de leite caprino não pasteurizado foram apontados como fontes de infecção e associados à doença por Eckman (1975), Sabbaghian (1975) e Young e Suvannoparrat (1975).

Os resultados obtidos nessa pesquisa estão de acordo com a literatura disponível sobre o assunto, tanto em relação a trabalhos antigos, como no que se refere a trabalhos recentes, demonstrando-se desse modo o papel que os alimentos de origem animal continuam tendo na atualidade como fontes e veiculadores de *Brucella sp* para o homem.

O isolamento de brucelas nos derivados de leite e carne analisados tem um importante significado regional, em face da expansão da produção de laticínios e



produção artesanal de derivados da carne no Estado do Pará e reflexos negativos presumíveis na cadeia produtiva da pecuária paraense (FREITAS, 2001).

## 5 CONCLUSÃO

Fontes potenciais de *Brucella* sp foram identificadas em amostras de produtos de origem animal como linguiça frescal e queijo dos tipos prato, coalhada crua, coalhada cozida, de origem desconhecida, expostos ao consumo. Medidas e ações de vigilância sanitária são necessárias no nível de produção e consumo, para fiscalizar a qualidade sanitária desses produtos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES FILHO, J. S. *Brucella* em queijo minas frescal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.19, n.117, p.12-17, nov./dez. 1964.
- AL-EISSA, Y. A.; KAMBAL, A. M.; AL-NASSER, M. N.; AL-HABIB, S. A.; AL-FAWAZ, I. M.; AL-ZAMIL, F. A. Childhood brucellosis: a study of 102 cases. *Pediatric Infectious Diseases*, v.9, n.2, p.74-9, Feb. 1990. Disponível em: <<http://www.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online>>. Acesso em: 22 jan. 2002.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M. *Las tecnicas de laboratorio en la brucelosis*. Washington, DC: Organización Mundial de la Salud, 1969. (Série de Monografias, n. 55).
- ALVES, C. J.; BARROS, A. A.; CARVALHO, M. G. X.; ARIMATÉIA, R. A.; ALVES, F. A. L. Pesquisa para aglutinina anti-*Brucella* no leite "in natura", comercializado nos municípios de Patos, Pombal e Teixeira (Paraíba, semi árido nordestino, Brasil). *Higiene Alimentar*, v.15, n.89, p.67-72, out. 2001.
- BRUCellosis associated with unpasteurized milk products abroad. *Weekly Epidemiological Record*, n.43, p.308-309, Oct. 1995.
- CANALES MUÑOZ, J. L.; AGUILLAR BENAVIDES, S.; FLORESSOARES, G.; BOETA GUERRERO, M. A.; VAZQUEZ CASTELLANOS, T. Estudio de un brote de brucelosis y valoración diagnóstica de las pruebas de laboratorio. *Revista Médica*, v.31, n.4, p.273-277, jul./ago, 1993.
- CHANTAL, J.; BESSIÈRE, M. H.; LE GUENNO, B.; MAGNAVAL, J. E.; DORCHIES, P. Dépistage serologique de certains zoonoses sur le personnel de l'abattoir de Djibout-ville. *Bulletin de la Société de Patologie Experimentelle*, v.89, n.5, p.353-357, 1996.
- CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.2, p.213-221, Apr./Jun. 1997.
- CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica, 1992. p.317-338.
- ECKMAN, M. R. Brucellosis linked to Mexican cheese. *Journal of the American Medical Association*, v.232, n.6, p.636-637, May, 1975.
- FOX, M. D.; KAUFFMAN, A. F. Brucellosis in the United States, 1965-1974. *Journal of Infectious Diseases*, v.36, n.2, Aug. 1977.
- FRANCE. Réseau National de Santé Publique. *La brucellose humaine en France en 1996*. Paris, 1996. Disponível em: <<http://www.rnsp-sante.fr/bea/1996/do-p18.html>>. Acesso em: 25 jan.2000.
- FREITAS, J. A. Qualidade do leite frente seu beneficiamento e obtenção de derivados. In: SEMINÁRIO DE ZOOTECNIA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ, 1., 2001, Belém. *Produção leiteira na Amazônia: desafios e novas perspectivas*. Belém: FCAP, 2001.133p p.105-110.



- FREITAS, J. A.; CARVALHO, R. C. F.; SARRAF, K. A.; OLIVEIRA, J. P. Infecção brucélica observada em bovinos e bubalinos abatidos para consumo. *O Biológico*, São Paulo, v.62, n.1, p.1-3, 2000.
- GIORGI, W.; FERNANDEZ, N. S.; CALDAS, A D. Isolamento de *Brucellas suis* de língua. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.30, p.109-113, set. 1963.
- LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C. H.; CUEVA, V. E. F. Abscessos na gordura perirrenal causados por *Brucella suis* em suínos infestados por *Stephanurus dentatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Série Veterinária, v.7, p.15-18, 1972.
- ; SECCHIN, H.; BAPTISTA, A M. Bursites brucélicas na cernelha de bovinos de abate e cuidados sanitários no matadouro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Série Veterinária, v.10, p.45-49, 1975.
- LANGONI, H. et al. Isolamento de *Brucella* sp do leite de vacas positivas para brucelose nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences*, v.37, n.6, 2000.
- LERCHE, M.; ENTEL, H. J. A presença de brucelas vivas em bovinos que reagiram sorologicamente (reação positiva). *Office International des Epizooties*, v.53, n.3/4, mar. 1960.
- MALIK, G. M. A Clinical study on brucellosis in adults in the Asir region of southern Saudi Arabia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.56, n.4, p.375-377, 1997.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; DELBEM, A C B.; LARA, J. A F.; PERRI, S. H. V. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializadas no município de Araçatuba e potenciais de riscos decorrentes de seu consumo. *Higiene Alimentar*, v.15, n.86, p.31-38, jul. 2001.
- REDAEELI, G. Sull'isolamento di microorganismi del genere *Brucella* dal latte e dagli organi di bovine reagenti positivamente alla fissazione del complemento. *Archivio Veterinario Italiano*, v.16, n.4, p.287-302, ago. 1965.
- ROBERTSON, L.; FARRELL, I. D.; HINCHLIFFE, P. M. The incidence of *Brucella* infections in producer-retailer herds in north Lancashire from 1965- to 1972. *Journal of Hygiene*, Cambridge, v.73, n.9, p.9-14, 1971.
- ROJAS VENTURO, L. A.; TELLO CONTRERAS, R. E. *Aislamiento e identificación de brucela em muestras de queso fresco de los diferentes mercados de Lima*. [S. l.: s.n.], 1993.
- SABBAGHIAN, H. Fresh white cheese as a source of *Brucella* infection. *Public Health*, London, v.89, p.165-169, 1975.
- SHIMSHONY, A. Epidemiology of emerging zoonosis. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.2, p.229-238, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Joint FAO/WHO expert committees in brucellosis*. Sixth report. Geneva, 1986. (WHO. Technical Series n. 740).
- YOUNG, E. J. N. An overview of human brucellosis. *Clinical Infectious Diseases*, v.21, p.283-90, 1995.
- ; SUVANNOPARRAT, U. Brucellosis outbreak attributed to ingestion of unpasteurized goat cheese. *Archive of Internal Medicine*, v.135, n.2, p.240-243, Feb. 1975.