



Detecção de *Brucella* sp. em leite informal comercializado no estado de Alagoas, Brasil: um breve alerta à saúde pública

[*Detection of Brucella sp. in informal milk marketed in the state of Alagoas, Brazil: a brief public health alert*]

"Comunicação Breve/Short Communication"

Otto Cabral **Portela**¹, Elizabeth Sampaio de **Medeiros**^{1*}, Daniel Dias **Silva**¹,
Renata Pimentel Bandeira de **Melo**¹, Manoela Rego Barros **Santos**¹, Maria Betânia Queiroz
Rolim¹, Tallison Filipe Lima **Oliveira**², Tamyres Izarely Barbosa **Silva**²

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

²Universidade Federal do Acre, Rio Branco-AC, Brasil.

*Autora para correspondência/Corresponding author: E-mail: sampaio.elizabeth@gmail.com

Resumo

A produção de leite constitui relevante atividade agropecuária no Brasil. O leite informal é o produto vendido diretamente do produtor ao consumidor, sem garantia de ter sido submetido a tratamentos térmicos ou obedecidas as condições mínimas de higiene exigidas para captação, transporte e comercialização. Devido aos riscos iminentes à saúde pública quanto à transmissão de patógenos, a exemplo de *Brucella* sp., a comercialização do leite *in natura* (informal) é proibida pela legislação brasileira. Objetivou-se realizar a identificação molecular *Brucella* sp. em amostras de leite informal comercializado no estado de Alagoas, Brasil. Foram coletadas amostras de leite bovino *in natura* provenientes de 100 pontos de venda informal, distribuídos em 80 municípios do estado de Alagoas. As amostras foram submetidas à centrifugação, extração de material genômico e reação em cadeia da polimerase. Dos 102 municípios que compõem o Estado de Alagoas, foi identificada a existência do comércio informal de leite em 80 destes (78,4%). Das 100 amostras analisadas de leite informal, 1% apresentou resultado positivo ao gênero *Brucella*. Conclui-se que, embora a baixa frequência verificada, o comércio informal do leite *in natura* comercializado em Alagoas pode conferir riscos para transmissão da brucelose à população consumidora do estado.

Palavras-chave: brucelose; produção leiteira; PCR.

Abstract

Milk production is a relevant agricultural activity in Brazil. Informal milk is the product sold directly from producer to consumer without guarantee that it has been subjected to heat treatments or that the minimum hygiene conditions required for collection, transport and marketing have been complied with. Due to the imminent risks to public health regarding the transmission of pathogens, such as *Brucella* sp., the marketing of fresh milk (informal) is prohibited by Brazilian law. The objective was to perform molecular identification of *Brucella* sp. in samples of informal milk marketed in the state of Alagoas, Brazil. Bovine natural milk samples were collected from 100 informal points of sale, distributed in 80 counties of the state of Alagoas. The samples were submitted to centrifugation, genomic material extraction and polymerase chain reaction. Of the 102 cities that composes the state of Alagoas, the existence of informal milk trade was identified in 80 of these (78.4%). Of the 100 samples of informal milk analyzed, 1% tested positive for the genus *Brucella*. It is concluded that, despite the low frequency, the informal trade of fresh milk marketed in Alagoas may confer risks for the transmission of brucellosis to the consuming population of the state.

Keywords: brucellosis; milk production; PCR.

O leite é considerado um dos alimentos mais completos por apresentar vários elementos importantes à nutrição humana, como materiais orgânicos e nitrogenados, caseína e albumina, sais minerais e vitaminas (Beloti et al., 2015). Sua produção representa um setor relevante à economia no Brasil. A pecuária leiteira é a sexta maior atividade agropecuária no Brasil e a segunda em Alagoas. O status de zona de risco médio para a febre aftosa, alcançado em 2009, proporcionou a abertura das barreiras sanitárias para o estado de Pernambuco, o que ampliou o mercado de produtos lácteos para o estado (ALAGOAS, 2017; Lima et al., 2017).

A comercialização direta do leite cru é proibida pela legislação brasileira, de acordo ao Decreto-lei nº 923, de 10 de outubro de 1969, mas em caráter precário e extraordinário pode ser autorizada desde que obedeça a critérios avaliados pelas autoridades locais (BRASIL, 2017). No entanto, a manutenção habitual deste comércio na zona urbana, abastecido por lojas varejistas de alimentos ou ambulantes, caracteriza o produto “leite cru” como informal (Abrahão et al., 2005).

O leite informal é o produto vendido diretamente do produtor ao consumidor, sem garantia de ter sido submetido a qualquer tratamento térmico ou obedecidas as condições mínimas de higiene exigidas para captação, transporte e comercialização deste produto (Belloti et al., 2015). Como o leite é muito perecível e por isso passível a contaminações por microrganismos, quando obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes possui elevada contagem bacteriana total, constituindo-se um risco à saúde da população brasileira, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (Nero et al., 2003; Motta et al., 2015).

Vários patógenos podem ser veiculados pelo leite, sobretudo o informal, possibilitando a ocorrência de distintas doenças, tais como intoxicações alimentares, clostridioses, febre tifoide e paratifoide leptospirose, listeriose, tuberculose e brucelose (BRASIL, 2010; Food Ingredients Brasil, 2011). Dentre estas, a brucelose se destaca como uma zoonose de distribuição mundial, causada por bactérias intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella*, que se relaciona em 25% da transmissão ao humano por meio do consumo de leite ou derivados lácteos não pasteurizados (Megid et al., 2016).

Nos anos de 2001 a 2004, foi realizado estudo de caracterização epidemiológica da brucelose nos estados da Bahia, Santa Catarina, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo, Sergipe, Tocantins e no Distrito Federal. Os resultados foram publicados no final de 2009 e mostraram que a doença se encontra distribuída em todo o território nacional (BRASIL, 2006).

Com o advento da biologia molecular, diferentes técnicas para detecção de microrganismos foram validadas, elevando a eficácia de testes diagnósticos em animais, bem como a identificação destes patógenos em produtos de origem animal (Paula et al., 2015; Silva et al., 2018). Assim, objetivou-se, por meio deste estudo, realizar a detecção molecular de *Brucella* sp. em amostras de leite provenientes do comércio informal no estado de Alagoas e caracterizar o risco à saúde coletiva por meio do consumo *in natura* deste produto.

Foram analisadas 100 amostras de leite bovino *in natura*, coletados em 100 pontos de venda informal, distribuídos em 80 municípios do estado de Alagoas (Figura 1). Foram considerados pontos informais de venda os locais que comercializavam sem selo de inspeção, tais como feiras livres. As amostras de leite estavam envasadas em garrafas pet à temperatura ambiente e a higiene do local de venda e do manipulador era inadequada.

No local da coleta, as amostras foram acondicionadas em tubos estéreis tipo Falcon 50mL, sendo transportadas em caixas isotérmicas, até o Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sendo congeladas a -20°C até seu processamento.

Como pré-etapa da extração de DNA, foi adotada centrifugação prévia dos 50mL do volume total do leite coletado, a 5.000 g durante 10 minutos, com descarte do sobrenadante e, transferência do sedimento obtido para criotubo estéril de 2mL, o qual foi submetido à nova centrifugação a 20.000 g por 5 minutos.

O produto final da centrifugação foi encaminhando à extração de DNA com o kit comercial *DNEasyBlood & Tissues* (Qiagen Biotecnologia Brasil Ltda®, São Paulo, Brasil), utilizando-se o protocolo descrito pelo fabricante. Nesta etapa, as células foram lisadas através da proteinase K e o DNA foi seletivamente ligado à

membrana do DNeasy durante a centrifugação. Os produtos remanescentes e os inibidores enzimáticos foram removidos por lavagem com soluções a base de álcool etílico e o DNA foi eluído em tampão.

As ampliações do DNA de *Brucella* sp. foram realizadas utilizando-se os *primers* ITS66

(5'-ACATAGATCGCAGGCCAGTCA-3') e ITS 279 (5'-AGATACCGACGCAAACGCTAC-3'), que amplificam a região ITS 16S-23S do RNAr, específica para o gênero (Alves et al., 2010; Boeri et al., 2018).

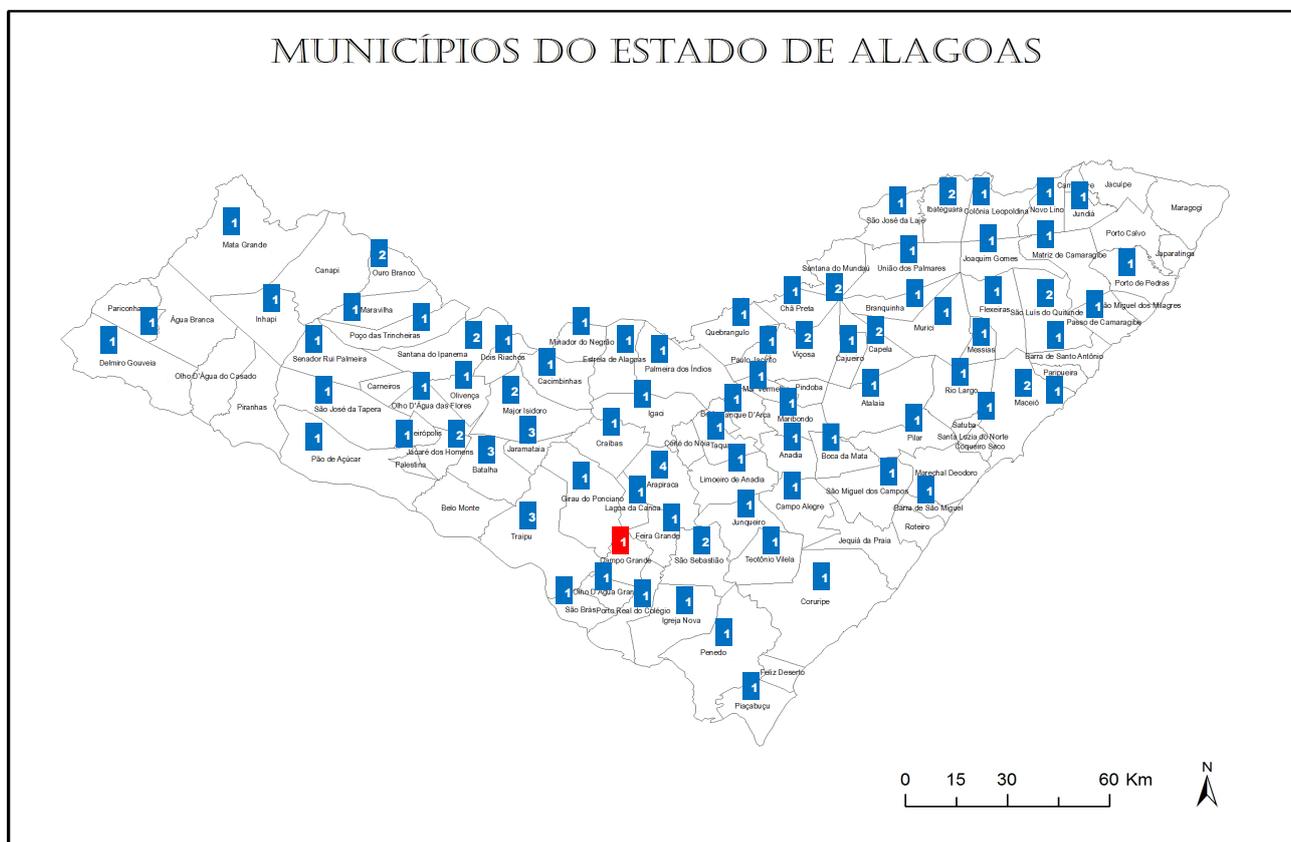


Figura 1. Mapa do estado de Alagoas-Brasil. Distribuição nos municípios e da quantidade de amostras de leite *in natura* coletadas por pontos de venda de comércio informal. Em vermelho, destaca-se o município no qual detectou-se *Brucella* sp.

As reações foram preparadas em criotubos de 200 μ L, tendo como volume final 12,5 μ L, contendo 2,5 μ L de DNA genômico, 0,5 μ L de cada *primer* específico na concentração de 10 pmol/ μ L, 2,75 μ L de água mili-Q ultrapura e 6,25 μ L de MasterMix (Qiagen Biotecnologia Brasil Ltda®, São Paulo, Brasil). O perfil térmico das etapas das reações foi realizado em termociclador (XP ThermalCycler - Bioxer Technology CO. LTD), consistindo em desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos para a desnaturação, 62°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 30 segundos para a extensão e extensão final a 72°C por 5 minutos (Alves et al., 2010).

A verificação do produto amplificado de 214 pares de bases (pb) foi realizada por

eletroforese de gel de agarose a 2%, onde os produtos da PCR foram corados com Blue Green (LGC Biotecnologia®, São Paulo, Brasil), visualizados através de luz ultravioleta e foto documentados. Para comparação do peso molecular dos fragmentos amplificados, foi utilizado marcador molecular de padrão de 100 pb (Thermo Fisher Scientific®, São Paulo, Brasil).

Dos 102 municípios que compõem o Estado de Alagoas, foi identificada a existência do comércio informal de leite em 80 destes (78,4%), dos quais 15 (18,75%) apresentavam mais de um ponto de comercialização, demonstrando a relevância do mercado ilegal de venda de leite no estado. Das 100 amostras de leite informal submetidas à PCR para a detecção de *Brucella* sp., uma (1%) foi positiva (Figura 2).

Os métodos de cultivo microbiológico e análises fenotípicas de crescimento bacteriano são empregados como testes de referência para detecção de *Brucella* spp. em amostras biológicas. Contudo, devido à característica fastidiosa de crescimento do agente, existe baixa sensibilidade no isolamento bacteriano (Amoroso et al., 2011). Além disso, a quantidade do patógeno na amostra clínica, o estágio da infecção, bem como o uso de antibióticos antes do diagnóstico microbiológico são ainda citados como fatores limitantes para o isolamento. E por ser classificado como microrganismo classe III, existe significativo risco biológico em situações laboratoriais (Ning et al., 2012).

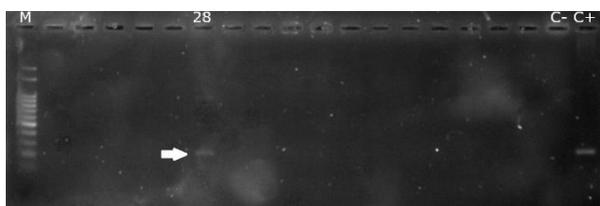


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2% de produtos amplificados na PCR para detecção de fragmento de 214 pb referentes à região ITS1 de *Brucella* sp. Marcador molecular de 100pb (M); amostra de leite positiva para DNA de *Brucella* sp. (28); controle negativo (C-); controle positivo (C+).

Métodos sorológicos indiretos como o ensaio imunoenzimático e o teste no anel no leite têm sido utilizados para detecção de anticorpos anti-*Brucella* no leite. Entretanto, resultados duvidosos podem ser gerados quando ainda não houve soroconversão ou através do uso extensivo de vacinas, o que incrementaria a resposta imune nas infecções em curso (Vanzini et al., 2001; Nielsen, 2002; Chand et al., 2005). Por conta dessas limitações, o uso de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), é adotado cada vez mais, sobretudo por sua rapidez, baixo risco biológico e incremento da sensibilidade (Yu e Nielsen, 2010; Amoroso et al., 2011; Caitano et al., 2014; Alamian et al., 2017).

No Brasil, Paula et al. (2013) detectaram a presença de *Brucella* spp. por PCR em 30 amostras de leite cru comercializadas clandestinamente e 50 amostras de leite entregues em laticínios, previamente à pasteurização na cidade de Botucatu-SP. Ainda na região Sudeste do Brasil, utilizando queijo oriundo de comércio ilegal, estudos comparativos entre técnicas de isolamento microbiológico e detecção molecular

de *Brucella abortus* foram realizadas por Myashiro et al. (2007). Nas 192 amostras totais utilizadas, não houve isolamento do microrganismo através de cultivo bacteriano, porém 19,27% (37/192) das amostras foram positivas para *Brucella abortus*.

Assim, o ensaio por PCR estabelece um diagnóstico mais rápido da enfermidade quando comparada aos métodos convencionais, com percentuais de confiabilidade similares ou superiores, podendo ser aplicada em diferentes amostras biológicas para detecção da *Brucella*, a exemplo do leite (Mitka et al. 2007).

Food and Agriculture Organization (FAO) e World Organization for Animal Health (OIE) consideram a brucelose como uma das zoonoses mais importantes e disseminadas no mundo, naturalmente transmissíveis entre os animais e os humanos. Além disso, suas implicações geram barreiras econômicas internacionais ao comércio de produtos de origem animal e perdas na indústria com a condenação de leite e carne, desvalorização monetária e altos custos com programas de controle, erradicação e pesquisas (Jardim et al., 2006).

Semelhante *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni*, *Brucella* sp. também é apontada como microrganismo patogênico para humanos associados ao consumo de leite cru de vacas, cabras e ovelhas, sendo encontrados em diversos casos de surtos causados pelo consumo de produtos lácteos crus em diferentes países (EFSA, 2015; Verraes et al., 2015). O ser humano pode contrair a doença através da ingestão de leite *in natura* ou derivados não submetidos ao tratamento térmico, nos quais a bactéria pode persistir durante vários meses (Seleem et al., 2010; EFSA, 2014).

Em diversas regiões do Brasil é comum as pessoas consumirem produtos de origem animal, que não sofreram inspeção pelos órgãos e profissionais competentes. Assim, o comércio clandestino destes produtos constitui ameaça real à saúde pública (Brasil, 2006).

Segundo Fonseca e Carvalho (2004), a comercialização de produtos lácteos sem inspeção no Brasil atinge níveis extremamente elevados. Independente da interpretação que se dê às estatísticas, tradicionalmente, considera-se que 45% do leite produzido advém da produção e comercialização informal. Características próprias de cada região conferem aos sistemas de produção de subsistência o atendimento à demanda do

mercado, sendo o excedente do consumo familiar, comercializado diretamente ao consumidor final sem nenhum tipo de tratamento (Brandão et al., 2015).

Com os achados deste levantamento preliminar, sugere-se a realização de um inquérito soro-epidemiológico do rebanho Alagoano devido à falta de informação sobre a doença, bem como, é imperativa a presença do Estado com políticas públicas voltadas a coibir o comércio ilegal de leite e implantar programas de educação sanitária, levando para a sociedade a importância de se conhecer a procedência dos produtos de origem animal. E, embora a baixa frequência verificada, o comércio informal do leite *in natura* comercializado em Alagoas pode conferir riscos para transmissão da brucelose à população.

Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Comitê de Ética

Os autores declaram para todos os efeitos que o projeto que deu origem aos dados atuais não foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), visto que os procedimentos metodológicos não envolveram a utilização direta de animais, sendo as amostras provenientes de pontos de venda informal de leite no estado de Alagoas. Entretanto, os autores estão cientes do conteúdo das resoluções brasileiras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Referências

- Abrahão, R.M.C.M.; Nogueira, P.A.; Malucelli, M.I.C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, 10(2): 1-17, 2005.
- ALAGOAS. Secretaria de Estado do Planejamento, Gestão e Patrimônio - Governo do Estado de Alagoas. **Estudo sobre a pecuária leiteira em Alagoas**. Maceió: SEPLAG, 2017. 37p.
- Alamian, S.; Esmaelizad, M.; Zahraei, T.; Etemadi, A.; Mohammadi, M.; Afshar, D.; Ghaderi, S.A Novel PCR Assay for detecting *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. **Osong Public Health and Research Perspectives**, 8(1): 65-70, 2017.
- Alves, C.J.; Figueiredo, S.M.; Azevedo, S.S.; Clementino, I.J.; Keid, L.B.; Vasconcellos, S.A.; Batista, C.S.A.; Rocha, V.C.M.; Higinio, S.S. Detection of *Brucella ovis* in ovine from Paraíba state, in the northeast region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41: 365-367, 2010.
- Amoroso, M.G.; Salzano, C.; Cioffi, B.; Napoletano, M.; Garofalo, F.; Guarino, A.; Fusco, G. Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella* sp. in water buffalo milk. **Food Control**, 22: 1466-1470, 2011.
- Beloti, V.; Tamanini, R.; Nero, L.A.; Moreira, M.A.S.; Silva, L.C.C.; Fagnani, R.; Reis, K.T.M.G. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Planta, 2015. 420p.
- Boeri, E.J.; Wanke, M.M.; Madariaga, M.J.; Teijeiro, M.L.; Elena, S.A.; Trangoni, M.D. Comparison of four polymerase chain reaction assays for the detection of *Brucella* spp. in clinical samples from dogs. **Veterinary World**, 11(2): 201-208, 2018.
- Brandão, J.B.; Breitenbach, R.; Dias, V.S.; Silva, F.B. Leite clandestino: a informalidade orientada pela demanda - um diagnóstico da produção e comercialização em Itaqui, Rio Grande do Sul. **Revista Extensão Rural**, 22(2): 113-131, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **RIISPOA. Aprovado pelo Decreto 9.013 de 29 de março de 2017**. Brasília. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 160p.
- Caitano, M.A.B.; Soares, C.O.; Ramos, C.A.N.; Ferraz, A.L.J.; Sanches, C.C.; Rosinha, G.M.S. Detecção de *Brucella abortus* em tecidos bovinos utilizando ensaios de PCR e qPCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(6): 497-502, 2014.

- Chand, P.; Rajpurohit, B.S.; Malhotra, A.K.; Poonia, J.S. Comparison of milk ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. **Veterinary Microbiology**, 108: 305-311, 2005.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. **EFSA Journal**, 13(1): 3940, 2015.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. **EFSA Journal**, 12(2): 3547, 2014.
- Fonseca, L.F.L.; Carvalho, M.P. **Leite - políticas e derivados**. Quiron Comunicação e Conteúdo, 158: 74-77, 2004.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. **FIB**, 19: 51-59, 2011.
- Jardim, G.C.; Pires, P.P.; Mathias, L.A.; Ribeiro, C.; Kuchembuck, M.R.G. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 26(3): 177-182, 2006.
- Lima, C.M.D.; Silva, E.S.; Oliveira, A.R.N.; Silva, J.C.S.; Moura, D.M.F. A pecuária leiteira no estado de Alagoas. **Diversitas Journal**, 2(2): 203-211, 2017.
- Megid, J.; Ribeiro, M.G.; Paes, C.P. **Doenças infecciosas em animais de produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016, 1294p.
- Mitka, S.; Contantine, A.; Efimia, S.; Eudoxia, D.; Athina K. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**, 45: 1211-1218, 2007.
- Motta, R.G.; Silva, A.V.; Giuffrida, R.; Siqueira, A.K.; Paes, A.C.; Motta, I.G.; Listoni, F.J.P.; Ribeiro, M.G. Indicadores de qualidade e composição de leite informal comercializado na região Sudeste do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(5): 417-423, 2015.
- Myashiro, S.; Scarcelli, E.; Piatti, R.M.; Campos, F.R.; Vialta, A.; Keid, L.B.; Dias, R.A.; Genovez, M.E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, 38(1): 17-22, 2007.
- Nero, L.A.; Mazie, D.; Bezzer, M.M.S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, 24: 21-26, 2003.
- Nielsen, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, 90: 447-459, 2002.
- Ning, P.; Guo, K.; Xu, L.; Xu, R.; Zhang, C.; Cheng, Y.; Cui, H.; Liu, W.; Lv, Q.; Cao, W.; Zhang, Y. Short communication: Evaluation of *Brucella* infection of cows by PCR detection of *Brucella* DNA in raw milk. **Journal of Dairy Science**, 95: 4863-4867, 2012.
- Paula, C.L.; Mioni, M.S.R.; Appolinário, C.M.; Katayama, E.R.; Allendorf, S.D.; Megid, J. Detecção de *Brucella* spp. em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, 82: 1-5, 2015.
- Seleem, M.N.; Boyle, S.M.; Sriranganathan, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, 140: 392-398, 2010.
- Silva, M.R.; Duch, A.A.S.; Lage, R.T.P.A.; Menezes, L.D.M.; Ribeiro, J.B.; Souza, G.M.; Soares Filho, P.M.; Fonseca Júnior, A.A.; Faria, L.S.; Costa, R.R. Ocorrência de *Brucella* em queijo Minas artesanal da microrregião do Serro: Um importante problema de saúde pública. **Revista Médica de Minas Gerais**, 28(5): 1-15, 2018.
- Vanzini, V.R.; Aguirre, N.P.; Valentini, B.S.; Torioni de Echaide, S.; Lugaresi, C.I.; Marchesino, M.D.; Nielsen, K. Comparison of an indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. **Veterinary Microbiology**, 82: 55-60, 2001.
- Verraes, C.; Vlaemynck, G.; Van Weyenberg, S.; De Zutter, L.; Daube, G.; Sindic, M.; Uyttendaele, M.; Herman, L. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. **Internacional Dairy Journal**, 50: 32-44, 2015.
- Yu, W.L.; Nielsen, K. Review of Detection of *Brucella* sp. by Polymerase Chain Reaction. **Croatian Medical Journal**, 51(4): 306-313, 2010.