

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Brucella* spp. EM
PORCOS-MONTEIROS (*Sus scrofa*) PROVENIENTES DO
PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE - BRASIL

Mônica da Silva Custódio

CAMPO GRANDE, MS.
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Brucella* spp. EM PORCOS-MONTEIROS (*Sus scrofa*) PROVENIENTES DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE - BRASIL

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Brucella* spp. IN FERAL SWINES (*Sus scrofa*) FROM MATO GROSSO DO SUL PANTANAL- BRAZIL

Mônica da Silva Custódio

Orientador: Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Grácia Maria Soares Rosinha

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS.
2013

A minha mãe Elizabeth Custódio. Pelo amor incondicional, exemplo e por fazer de meus sonhos, seus sonhos.

Dedico.

Eu busco tempo para tantas coisas
São tantos planos para pouco tempo
Em meio a tudo o que exige tempo
Eu já não tenho tempo pra falar com Deus
Eu me disponho para o trabalho
E sem notar eu perco o horário
Só resta tempo pra fechar a porta
Pra tudo que na realidade importa

Não tenho tempo para descansar
Rever amigos e conversar
Já não consigo me assentar a mesa
E alimentar o que a alma almeja
E quando eu quero viver o tempo
Tal fumaça some num momento
E antes que tudo perdido esteja
E antes que tarde demais eu perceba que

Ganhei meu mundo
Perdendo a alma
Tentei de tudo
Me vi sem calma
Busquei tão longe
Quando tão perto
Teria tudo do jeito certo
Vem ser o Senhor deste mundo
Vem ser o Senhor da minha vida
Em todo tempo, Deus...

Paulo César Baruk
Senhor do Tempo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Cleber Soares pela oportunidade de realizar a pós-graduação sob sua orientação. Obrigada!

A Dra. Grácia Rosinha pela orientação, compreensão para com minhas dificuldades pessoais e científicas, por acreditar que sempre podia fazer mais. Por se preocupar comigo e dispensar parte de seu tempo para fazer comentários e correções pertinentes ao meu trabalho. Obrigada!!

A Dra. Carina Elisei por sempre ser tão solícita aos pedidos de correções dos trabalhos.

A Dra. Aiesca Pellegrin por seu ótimo humor e pelas amostras de sangue e de soro dos porcos-monteiros, pois sem eles não seria possível realizar os experimentos.

Ao Dr. André Ferraz e Dr. Carlos Ramos pelos ensinamentos e orientações dispensadas ao longo dos procedimentos laboratoriais. Ambos nunca recusaram em prestar auxílio e responder aos inúmeros questionamentos; mostrando sempre paciência e solicitude.

Ao Dr. Wilson Koller pelas longas conversas, conselhos, auxílios, comentários, lanches e cuidados. Obrigada por se importar tanto comigo.

Ao amigo Namor Zimmerman pelas conversas, arguições e correções ao longo do trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Engenharia Genética Animal da Embrapa Gado de Corte. Em especial:

A Aline Gonçalves, por suas brincadeiras recheadas de sinceridade!!! Obrigada por me ajudar na execução desse trabalho e também nos conselhos e orientações pessoais.

A Anna Louzan, por sempre me lembrar da força interior que insistentemente esquecia que tinha.

A Marrielen Caitano, que junto comigo aprendeu a técnica da qPCR. Rendeu ótimas conversas, aprendizagem e risadas.

A Renata Bastos pelas constantes conversas, histórias e músicas... Não tem como esquecer.

A Goretti dos Santos, pelo auxílio na execução das técnicas, cálculos, pelo acompanhamento, conselhos e orientações. Não me esquecerei da excelente profissional que mostrou ser e a ótima companhia que você me proporcionou.

A minha família, em especial:

A minha mãe, Elizabeth Custódio que sempre esteve preocupada com minha alimentação, horas de sono, descanso e cuidados pessoais... Nunca cansou de se importar... Mãe é mãe e a minha mostrou todos os dias o quanto desempenha bem essa função! A senhora é tudo pra mim!!!

A minha irmã, Deyse Custódio pelas longas conversas, conselhos e bate-papo... Essa nunca me disse: "Estou ocupada e não posso!". Sempre tão solícita quando precisei. Não sei o que faria sem minha irmã!! Meu grude e meu orgulho!! Obrigada pelo incentivo e por, às vezes, acreditar mais em mim, do que eu mesma...

Ao meu irmão, Eliel Custódio que é a nossa criança! Este sempre me espera no fim do dia e assim que entro em casa já vem com um lindo sorriso e um abraço apertado...

Agradeço a minha família por nunca medirem esforços para me ajudar e apoiar...

Não posso esquecer-me dos meus amigos... Jaire Marinho (várias vezes liguei só para pedir conselhos... Obrigada), Priscilla Correa e Edna Michelleti (meninas super especiais e inesquecíveis), a Damires (pelas orações e palavras de conforto), a Mayara (pelos sorrisos e por me mostrar que a vida não precisa ser levada tão a sério), ao Clube de Desbravadores Diamante de Sangue e ao Pr. Lins por acreditar e reafirmar sua confiança em mim.

Resumo

CUSTÓDIO, M.S. Identificação molecular de *Brucella* spp. em porcos-monteiros (*Sus scrofa*) provenientes do pantanal sul-mato-grossense_Brasil. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Relatos da ocorrência da brucelose tem se intensificado em populações silvestres que mantêm relação simpátrica com bovinos. Animais como os porcos-monteiros (*Sus scrofa*) encontram-se em grande quantidade no Pantanal de Mato Grosso do Sul, utilizando o mesmo *habitat* que animais domésticos e silvestres. Devido a importância da brucelose e os crescentes relatos sobre a transmissão de *Brucella* spp. entre animais domésticos e silvestres, no presente estudo teve-se como objetivo avaliar o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) para identificar a presença deste patógeno em porcos-monteiros. Foram capturados e coletadas amostras de sangue de 30 porcos-monteiros no Pantanal Sul-Mato-Grossense, sendo realizado o teste sorológico do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). O DNA genômico das amostras de sangue foi extraído e posteriormente realizada a amplificação por meio da PCR, utilizando os pares de oligonucleotídeos Ery 1 e 2, IS711 e BruAb2_0168. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e corados com *SYBR Safe*[®], a fim de observar os fragmentos amplificados. Os resultados observados no teste sorológico revelaram que cinco animais (16,66%) foram considerados sororreagentes para o AAT. Utilizando-se o oligonucleotídeo BruAb2_0168, 26 (86,66%) amostras apresentaram fragmento de aproximadamente 81 pares de base (pb), correspondente à espécie *B. abortus*. Utilizando IS711 foi possível observar que 20 (66,66%) amostras com fragmento de aproximadamente 63 pb. Os oligonucleotídeos Ery 1 e 2 identificaram 7 (23,33%) amostras positivas, sendo sete amostra vacinal S19 e destas, três amostras para amostra de campo S2308. Os dados da qPCR demonstraram que que 27 (90%) animais foram considerados positivos quando submetidos ao oligonucleotídeo BruAb2_0168. Os dados apresentados revelam a circulação das amostras virulenta e vacinal de *B. abortus* nos porcos-monteiros e estes podem ter importante participação epidemiológica na cadeia da brucelose para animais silvestres e domésticos da região, incluindo o homem.

Palavras-chave: Brasil; brucelose; Pantanal; PCR; porco-monteiro; qPCR.

Abstract

CUSTÓDIO, M. S. Molecular identification of *Brucella* spp. in feral swine (*Sus Scrofa*) from Mato Grosso do Sul, Pantanal – Brazil. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Reports of the occurrence of brucellosis has intensified in wild populations that maintains respect sympatric with cattle. Animals such as feral swine (*Sus scrofa*) are found in large quantities in the Mato Grosso do Sul, Pantanal, using the same habitat that wild and domestic animals. Due to the importance of brucellosis and increasing reports of transmission of *Brucella* spp. between domestic and wild animals, in the present study aimed evaluate the use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) to identify the presence of this pathogen in feral swine. Were captured and collected blood samples from 30 feral swine in the Mato Grosso do Sul, Pantanal, being performed serologic testing Antigen Buffered Acidified (AAT). Genomic DNA from blood samples was extracted and subsequently submitted to PCR amplification using the pairs of primers Ery 1 and 2, IS711 and BruAb2_0168. The products were visualized by electrophoresis on agarose gel and stained with *SYBR Safe*[®] in order to observe the amplified fragments. The results observed in serologic testing revealed that five animals (16.66%) were seropositive for AAT. Using the primer Bruab_0168, 26 (86.66%) samples fragment of approximately 81 base pairs (bp) corresponding to *B. abortus*. Using IS711 was observed that 20 (66.66%) samples with approximately 63 bp. Primers Ery 1 and 2 identified 7 (23.33%) positive samples, seven vaccine strain S19 and among these these three with field sample S2308. The qPCR data showed that 27 (90%) animals were considered positive when subjected to BruAb2_0168 primer. The data show the movement of samples virulent and vaccine *B. abortus* in feral swine and these can have an important stake in the epidemiological chain of brucellosis in wild and domestic animals in the region, including man.

Keywords: Brazil; brucellosis; feral swine; Pantanal; PCR; qPCR

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Pantanal.....	11
2.2 Atividade pecuária no Pantanal.....	12
2.3 Brucelose em bovinos no Pantanal.....	14
2.4 Brucelose nos animais silvestres no Pantanal.....	14
3. Porco-monteiro no Pantanal.....	15
4. Brucelose.....	16
4.1 Agente etiológico.....	16
4.2 Transmissão e patogenia.....	17
4.3 Sinais clínicos.....	19
4.4 Brucelose em animais domésticos.....	20
4.5 <i>Brucella</i> spp. nos reservatórios silvestres.....	21
4.5.1 Brucelose em suínos silvestres.....	22
4.6 Diagnóstico da brucelose.....	24
4.6.1 Diagnóstico bacteriológico.....	24
4.6.2 Diagnóstico sorológico.....	25
4.6.3 Identificação de espécies de <i>Brucella</i> por PCR e qPCR.....	28
Referências.....	31
Artigo científico 1.....	42
Artigo científico 2.....	53

INTRODUÇÃO

O Pantanal é reconhecido como Patrimônio Nacional e designado pela UNESCO como Reserva da Biosfera, de grande significância global. Existe uma tendência de substituição da pecuária extensiva tradicional por sistemas mais intensivos, acompanhada do desmatamento para implantação de pastagem cultivada e degradação de cursos de água o que poderá ameaçar o frágil equilíbrio do ecossistema da região (MAURO et al., 2002). Alterações no ambiente podem modificar a dinâmica de várias doenças, inclusive da brucelose, por introdução de fatores de risco relacionados ao manejo dos animais, quando da intensificação do sistema de produção. O atual aumento na incidência da brucelose pode ser atribuído a modificações nos sistemas de criação, alterações ecológicas e de uso da terra além da ocorrência, cada vez mais comum, de interações entre rebanhos domésticos com a vida silvestre (MENEGHI, 2006).

A brucelose é uma enfermidade com distribuição mundial, causada por bactérias gram-negativas, do gênero *Brucella* que infectam diversas espécies animais e humanos (WHATARAI, 2006). Está entre as doenças de maior ocorrência, causadora de prejuízos econômicos e impactos nos sistemas de saúde pública em todo o mundo.

A brucelose vem sendo amplamente debatida devido a aspectos de sua epidemiologia, principalmente após relatos de ocorrência dentre animais silvestres com potencial para continuamente transmitir o organismo aos animais domesticados (PAPPAS, PAPADIMITRIOUS, 2007). A variedade de animais silvestres que podem ser infectados por *Brucella* spp. é ampla, tendo sido isolada em bisões (*Bison bison*), alces (*Cervus elaphus*), suínos silvestres (*Sus scrofa feral*), raposas (*Vulpes vulpes*), lebres (*Lepus capensis*), búfalos Africanos (*Syncerus caffer*), renas (*Rangifer tarandus tarandus*), caribu (*Rangifer tarandus groelandicus*), cabras montesas (*Rupicapra rubicapra*) e o ibex (*Capra ibex*) que devem ser considerados como possíveis reservatórios na vida silvestre (GODFROID et al., 2005).

Desde 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) objetivando diminuir o impacto negativo destas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade na pecuária nacional (BRASIL, 2006). Apesar do estabelecimento de programas de erradicação da brucelose, essa enfermidade continua sendo um problema de saúde pública mundial com severas consequências econômicas para a pecuária.

Nos bovinos, os testes sorológicos têm sido usados na rotina para identificar os sororeagentes para o gênero *Brucella* spp. (BRASIL, 2006). Nos animais silvestres o uso desses testes sorológicos é amplamente difundido com o objetivo de avaliar a presença ou distribuição de *Brucella* spp. apesar de não estarem devidamente padronizados para as variadas espécies de animais silvestres (GODFROID et al., 2010).

A utilização de testes moleculares como a reação da cadeia em polimerase (PCR) convencional e PCR em tempo real (qPCR) constituem uma alternativa rápida no diagnóstico de *Brucella* spp. tanto para animais silvestres quanto para animais domésticos, sendo que o diagnóstico pode ser feito a partir de materiais biológicos variados como o sangue e o leite (GODFROID et al., 2010).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pantanal

O Pantanal é uma extensa planície sazonalmente inundável, com uma área brasileira de 138.183 Km², abrangendo dois estados: Mato Grosso (35,36%) e Mato Grosso do Sul (64,64%), e três países Brasil, Bolívia e Paraguai. O verão (novembro-março) é quente e chuvoso e o inverno (abril-outubro) quente e seco, exceto por eventuais frentes frias vindas do sul, que podem provocar quedas abruptas na temperatura, segundo dados de Mourão et al. (2002). Na época das enchentes, o nível das águas nas planícies pode subir mais de um metro e grande parte do Pantanal fica submersa (MOURÃO et al., 2002). Na época de seca, somente persistem alguns rios, poços e lagoas perenes, e os animais silvestres se concentram em torno destes corpos d'água.

Embora o Pantanal seja um ecossistema distinto, pode ser estratificado em subregiões (figura 1) que diferem na hidrologia e na fisionomia da vegetação. Sua densidade de vida silvestre é considerada a mais alta dos neotrópicos.



Figura 1. Subregiões do Pantanal brasileiro. Bacia do Alto Paraguai e Pantanal no Brasil.

O Pantanal é considerado patrimônio nacional, desde a Constituição de 1988, e a sua exploração é condicionada à conservação dos seus recursos naturais, tendo sido também reconhecido pela UNESCO, no ano 2000, como Reserva da Biosfera (HARRIS et al., 2005).

Alterações nesse ambiente podem modificar a dinâmica de prevalência e difusão de várias enfermidades, inclusive da brucelose, pela introdução de fatores de risco relacionados ao manejo dos animais ou da intensificação dos sistemas de produção. O aumento na incidência da brucelose pode ser atribuído a modificações nos sistemas de criação, alterações ecológicas e de uso da terra além da ocorrência, cada vez mais comum, de interações entre rebanhos domésticos e a vida silvestre (MENEGHI, 2006).

2.2 Atividade pecuária no Pantanal

A pecuária no Estado de Mato Grosso do Sul teve início com colonos espanhóis, que se instalaram no Pantanal Sul-Mato-Grossense a partir do ano de 1600, tendo servido primeiro como pecuária de subsistência (ESSELIN, 2003). Com a criação das sesmarias, surgiram as primeiras fazendas de gado na região e, desde então, espalhou-se por todo o Pantanal, como criação extensiva, tornando-se a principal atividade

econômica da região (ALMEIDA et al., 1996). Com o aporte de novas raças de bovinos, certas doenças infectocontagiosas foram introduzidas, como por exemplo, a brucelose.

O Brasil detém hoje o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 180 milhões de cabeças. A maior parte está concentrada na região Centro-Oeste, que possui o maior rebanho nacional com mais de 56 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2012). O número total de propriedades no estado é de 38.346, divididas entre as regiões do Pantanal e do Planalto. As propriedades da região do Pantanal, formada por oito municípios, são essencialmente de corte, enquanto que na região do Planalto, formada por 71 municípios, existem propriedades de exploração de corte e de leite (CHATE et al., 2009).

2.3 Brucelose em bovinos no Pantanal

Dentre os diversos problemas sanitários que afetam o rebanho pantaneiro, a brucelose vem sendo diagnosticada em diversas propriedades por meio de estudos epidemiológicos (PELLEGRIN et al., 2006). Cavalléro (1998) relata que pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) foi realizado um levantamento sorológico, onde foi possível encontrar 8,08% (206/2.276) de animais positivos para *Brucella* spp. pelo teste Soroaglutinação Rápida (SAR) e 10,19% (231/1.942) de amostras positivas pelo teste do AAT. No Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul, 309 touros e matrizes testados, estes apresentaram taxas de 6,9% e 2% de positivos, respectivamente (PELLEGRIN et al., 1999). Em outra região do Pantanal, localizada no Estado de Mato Grosso, Tocantins et al. (2000) indicaram que a brucelose estava presente em 82% das propriedades destinadas à criação de bovinos, tendo em média 10% de prevalência de animais infectados. Esses indivíduos infectados, ao eliminar a bactéria para o ambiente, colaboram na disseminação para o rebanho e para as espécies silvestres (TOCANTIS et al., 2000).

2.4 Brucelose nos animais silvestres no Pantanal

Alguns trabalhos voltados ao estudo de brucelose em animais silvestres vêm sendo desenvolvidos nas Américas. No Brasil, porém, os conhecimentos sobre doenças infecciosas que acometem animais silvestres, incluindo a brucelose, são escassos. Tal situação dificulta a elaboração de planos estratégicos de controle dessa doença em regiões que lhe são ecologicamente favoráveis e que abrigam grande densidade de animais silvestres (GIRIO et al., 2003).

Atualmente, alguns estudos vêm sendo realizados na região do Pantanal Sul-Mato-Grossense, com o propósito de demonstrar a presença de *Brucella* sp. nos animais silvestres. Mathias et al. (1999) coletaram amostras de soro de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal Sul-Mato-Grossense e no Parque Nacional das Emas, no Estado de Goiás. Nesse estudo, os soros foram examinados por AAT e teste de fixação do complemento, sendo estes soros considerados negativos quando testados. No entanto, em estudos realizados por Elisei et al. (2010) foi possível identificar a presença de *Brucella* sp. a partir do sangue de veados-campeiros coletado na região da Nhecolândia. Paes et al. (2009) relataram a ocorrência de *Brucella* spp. em veados-campeiros nas regiões sul-mato-grossense e mato-grossense e, em javalis (*Sus scrofa*) no Parque das Emas, na região da Nhecolândia e de Rio Negro. Animais como queixadas (*Tayassu pecari*) foram identificadas como sororreagentes para *Brucella* spp., enquanto que animais como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) sugerem ser suscetíveis ao contato com esse patógeno, de acordo com estudos realizado por Ito et al. (1998), no município de Corumbá.

Na América Latina, vários trabalhos têm sido conduzidos, como na Bolívia, veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) que foram capturados no Grande Chaco e examinados, sendo que nenhum animal apresentou reação positiva para *B. abortus* (DEEM et al., 2004). Na Reserva Campos *del Tuyu*, na Argentina, foram capturados 14 veados-campeiros e submetidos a teste sorológicos. Nenhum dos animais examinados foi considerado positivo para brucelose (UHART et al., 2003). Bovinos domésticos também foram amostrados e somente um (1/27) animal foi positivo para *Brucella* spp. (UHART et al., 2003).

Em estudo sorológico e bacteriológico conduzido na Venezuela com catetos, Lord; Lord (1991) obtiveram isolados de *B. suis* a partir de baço e linfonodos. Também foram encontrados anticorpos contra *Brucella* spp. nas amostras de soro por meio dos testes AAT, soroaglutinação em tubo, 2-mercaptoetanol, rivanol, fixação de complemento e teste de cartão.

3. Porco-monteiro no Pantanal

Os primeiros suínos que chegaram ao Brasil vieram com a expedição de Martim Afonso de Souza em 1532, que se estabeleceu em São Vicente no litoral paulista. Muitos escaparam e embrenharam-se pelas matas formando grupos independentes (MAURO, 2002). Altamente prolífera, a espécie adaptou-se à região e tornou-se feral

em decorrência do abandono de suas criações, por ocasião da guerra do Paraguai, quando as fazendas foram devastadas e abandonadas (DESBIEZ et al., 2011). As condições do meio selecionaram adaptações fisiológicas e comportamentais que influenciaram sua morfologia atual, a ponto de aproximá-lo de seus ancestrais selvagens e diferenciá-lo, cada vez mais, do porco doméstico, apesar de pertencerem à mesma espécie.

O porco em estado feral (*Sus scrofa*) é uma das espécies de mamíferos invasores mais bem sucedidas do mundo (LOWE et al., 2000). São geralmente pragas para a agricultura, causando prejuízos à lavoura, degradação da terra e até predação de bezerros e cordeiros recém-nascidos. Além disso, esses animais são reservatórios de vários agentes etiológicos de doenças infecciosas, inclusive a brucelose (CORNER, 2006; HAMPTON et al., 2006). Existe a preocupação de que os impactos causados por porcos-monteiros possam aumentar substancialmente se as práticas de caça tradicional forem abandonadas (DESBIEZ et al., 2011).

Esses porcos são conhecidos no Pantanal brasileiro como porcos-monteiros (*Sus scrofa*). Essa espécie já se estabeleceu na região e entender a sua ecologia é importante por razões conservacionistas e econômicas. Segundo o trabalho de Mourão et al. (2002) maiores concentrações de grupos de porcos-monteiros no Pantanal têm sido observadas na sub região de Aquidauana e Rio Negro, e nas porções mais altas do Pantanal Central (sub-regiões de Nhecolândia e Leque do Taquari) (Figura 2). Nesse mesmo estudo, registraram a existência de aproximadamente 9.800 grupos de porcos-monteiros em todo o Pantanal, com um erro padrão de 1.400.

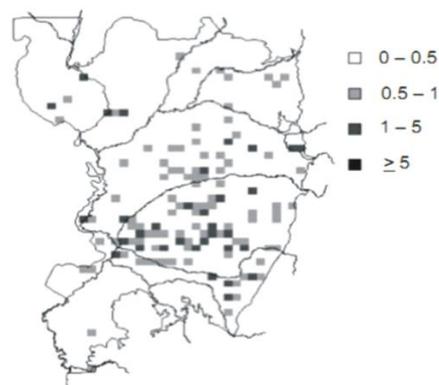


Figura 2. Distribuição de porcos-monteiros (grupos/Km²) no Pantanal Sul-Mato-Grossense (MOURÃO et al., 2002).

Os porcos-monteiros podem frequentar habitats muito diversos como brejos, campos e áreas florestadas e, além disso, podem ter hábitos diurnos ou noturnos (MOURÃO et al., 2002). No Pantanal, os adultos podem viajar longas distâncias para satisfazer sua necessidade de água, além de se beneficiarem de pontos artificiais de água escavados para o gado (MURI et al., 2007).

Alguns fazendeiros reclamam de danos causados nas pastagens, principalmente nas proximidades de banhados e vazantes, mas não existem estudos quantitativos sobre os danos que estariam relacionados com a ação de porcos-monteiros. Esses animais são reconhecidos como pragas em muitos locais do mundo, e geralmente causam impacto negativo no ecossistema que ocupam. Podem transmitir doenças para homens e outros animais e competir com espécies nativas, sendo, inclusive, implicado na extinção de espécies de plantas e animais locais (OLIVER; BRISBIN, 1993).

As consequências ecológicas da sua invasão são ainda pouco compreendidas. A primeira vista, eles se beneficiam e contribuem para o estado de conservação da vida silvestre na região e são de grande importância para a cultura pantaneira, pois têm sido a principal caça de subsistência pelos moradores locais, que capturam, castram e soltam os leitões machos e abatem a tiros os capados e porcas adultas, eventualmente encontradas (EMBRAPA, 1993).

Após a castração, os porcos-monteiros engordam e chegam a fornecer 20-30 litros de gordura. Esse óleo não é comercializado pelos fazendeiros, o que torna a gordura economicamente importante para a conservação de carnes nas fazendas onde não há fornecimento de energia elétrica e é uma fonte alternativa de proteína animal, sendo consumida ao menos uma vez por mês pelas comunidades locais, segundo Debiez et al. (2011).

4. Brucelose

4.1 Agente etiológico

A brucelose é uma zoonose, na maioria dos casos de evolução crônica, causada por uma bactéria intracelular facultativa do gênero *Brucella*, que infecta células do sistema mononuclear fagocitário e que acomete mamíferos domésticos e silvestres. As espécies desse gênero são bactérias gram-negativas, cocobacilares, imóveis, aeróbias e não formadoras de esporos. Filogeneticamente, pertencem ao grupo Rhizobiaceae, sub-classe das α -2 Proteobactérias e são relacionadas, mais intimamente, com diversas

espécies de bactérias intracelulares que vivem em associação com plantas ou células eucarióticas (MORENO et al., 2002; PAPPAS; PAPADIMITRIOUS, 2007).

As espécies de *Brucella* podem ser divididas em dois grupos coloniais distintos, classificados de acordo com as características fenotípicas: as lisas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ceti*, *B. pennipedialis* e *B. microti*) e as rugosas (*B. neotomae*, *B. ovis* e *B. canis*). Essa divisão se dá em função da presença ou ausência da cadeia O, que está localizada na parede externa de *Brucella* spp. e que determina a característica lisa ou rugosa da colônia. Tem sido proposto que as espécies de *Brucella* constituam um gênero monofilético (MORENO; MORIYON, 2002), em virtude do alto grau de similaridade entre elas, suportando a proposta de que as espécies clássicas de *Brucella* sejam cepas derivadas de *B. melitensis*. Por isso, foi proposto tratar-se de uma única espécie: *B. melitensis*, que se subdivide em *B. melitensis* biovar *abortus*, *B. melitenstis* biovar *suis*, *B. melitensis* biovar *canis*, *B. melitensis* biovar *neotomae*, e *B. melitenstis* biovar *ovis* (VERGER et al., 1985).

A comum associação patógeno-hospedeiro possibilita a classificação das espécies de *Brucella* da seguinte forma: *B. melitensis*, com ocorrência principal em caprinos, mas que pode infectar bovinos, ovinos, canídeos e humanos; *B. abortus*, em bovinos, bubalinos, cervídeos, canídeos e seres humanos; *B. ovis* em ovinos; *B. suis* em suínos e bovinos, *B. neotomae* em ratos do deserto, *B. canis* em cães, podendo infectar também os seres humanos (CORBEL; BRINLEY MORGAN, 1984); *B. microti* que infecta raposas (SCHOLZ et al., 2009) e ratazanas (SCHOLZ et al., 2008); *B. ceti* capaz de infectar golfinhos e baleias; *B. pennipedialis* ocorrendo em focas e em leão marinho (FOSTER et al., 2007). Recentemente, foi descrita uma nova espécie de *Brucella* denominada de *B. inopinata* isolada de humano com sinais clínicos de brucelose (SCHOLZ et al., 2010).

4.2 Transmissão e patogenicia

As bactérias do gênero *Brucella* entram no organismo do hospedeiro pela mucosa do trato digestivo, genital, nasal e conjuntiva ocular. A principal porta de entrada para os bovinos é a mucosa orofaríngea (BISPO et al., 1994). Durante a infecção, a bactéria tem a capacidade de sobreviver à ação bactericida dos neutrófilos e de se multiplicar no interior de macrófagos. A bactéria internalizada por fagócitos pode tanto ser destruída no interior de fagolisossomos e de sobreviver nestes compartimentos ou multiplicar-se em sítios intracelulares de replicação. Quando *B. abortus* está

opsonizada, ela se torna mais susceptível a ação bactericida dos macrófagos (GORVEL; MORENO, 2002). Uma vez dentro da célula, a bactéria inibe a fusão do lisossomo com fagossomo e se replica no retículo endoplasmático rugoso (DETILLEUX et al., 1990; PIZARRO-CERDÁ et al., 1998).

As formas lisas de *B. abortus* são mais eficientes no processo de invasão e resistentes à degradação por fagócitos que as formas rugosas, indicando que o lipopolissacarídeo (LPS) de *Brucella* é um fator de virulência com papel importante na sobrevivência das bactérias (GORVEL; MORENO, 2002; KO; SPLITTER, 2003). A partir do sistema circulatório, as bactérias difundem-se para os tecidos do hospedeiro, colonizando principalmente órgãos do sistema mononuclear fagocitário, tais como, baço, fígado e linfonodos nos quais podem acarretar alterações inflamatórias e anatomopatológicas caracterizadas por granulomas difusos, levando à esplenomegalia, hepatomegalia e, às vezes, hiperplasia linfóide (POESTER et al., 2002).

A transmissão ocorre, principalmente, a partir de um animal infectado que ao eliminar o patógeno no ambiente favorece a disseminação da bactéria e consequentemente a contaminação de fontes d'água, pastos, forragens e fômites. Há um favorecimento na difusão da doença pelo hábito de bovinos, principalmente vacas, ao lambar e cheirar animais recém-nascidos, ou mesmo fetos abortados (NICOLETTI, 1980).

As fêmeas de bovinos são mais susceptíveis à doença, sobretudo, quando prenhes, e quase todas permanecerão cronicamente infectadas com o agente presente no útero e linfonodos (BISHOP et al., 1994). Touros também possuem papel importante na transmissão da brucelose, pois eliminam a bactéria através do sêmen o que não deve ocorrer com novilhos e animais castrados (PAULIN, 2003).

A transmissão da brucelose por meio da monta natural, entre bovinos e bubalinos, parece não ser de grande importância, pois o sêmen é depositado na vagina, onde existem barreiras inespecíficas que dificultam o processo da infecção. Entretanto, um touro infectado não pode ser utilizado como doador de sêmen; isso porque, na inseminação artificial, o sêmen é introduzido diretamente no útero, permitindo infecção da fêmea com pequenas quantidades do agente, sendo por isso uma importante via de transmissão e eficiente forma de difusão da enfermidade (BRASIL, 2006).

Por outro lado, a transferência de embriões, desde que realizada conforme as recomendações internacionais para lavagens, não apresenta risco de transmissão de

agentes infecciosos e sendo executada dessa forma, é considerada uma técnica segura (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999; BRASIL, 2006).

Entre suínos a doença é geralmente transmitida por meio do consumo de alimentos contaminados ou por produtos de aborto, tais como fetos abortados e/ou membranas da placenta (OIE, 2009). A transmissão venérea também é comum em porcos, sendo que javalis sintomáticos e assintomáticos podem excretar *Brucella* spp. no sêmen (ANON, 2007). A transmissão pode ocorrer por inalação, por meio da conjuntiva ou pela pele lesionada, mas essas formas parecem ser de baixa importância epidemiológica em porcos.

4.3 Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos observados nos animais infectados estão ligados a problemas reprodutivos. Em fêmeas, observa-se o aborto no terço final da gestação (METCALF et al., 1994); diminuição na produção da carne, e aumento no intervalo entre partos. Estima-se que a brucelose cause perdas econômicas de 20 - 25% na produção leiteira, devido aos abortos e aos problemas de fertilidade (MIRANDA et al., 2008).

Animais jovens, antes da puberdade, parecem ser mais resistentes à infecção e caso o animal não esteja prenhe, geralmente ocorre à colonização de *B. abortus* nos linfonodos e nas glândulas mamárias (NICOLETTI, 1980, BISHOP et al., 1994). Quando prenhes, as bactérias colonizam órgãos com maior disponibilidade de eritritol, que está presente no útero gravídico, provocando, dessa forma, o aborto.

No aparelho reprodutivo masculino, pode ocorrer reação inflamatória do tipo necrosante nas vesículas seminais, testículos e epidídimos, provocando infertilidade ou esterilidade. Como seqüela subsequente pode haver atrofia do órgão afetado (PAULIN, 2003).

Outras alterações são observadas como no aparelho locomotor. A presença do patógeno no aparelho locomotor leva a infecções articulares causando bursites, principalmente nas articulações carpianas e tarsianas, e espondilites, especialmente nas vértebras torácicas e lombares (PAULIN, 2003).

Nos porcos domésticos, a brucelose manifesta-se como aborto, que ocorre muito cedo ou a qualquer momento durante a gestação. Nos machos, a brucelose é mais persistente, provocando lesões no trato genital, muitas vezes levando a interferência

com a atividade sexual, que pode ser temporária ou permanente (OIE, 2009). Em ambos os sexos, já foi observada lesões extragenitais, como linfadenite, abscessos subcutâneos, artrite e espondilite (OIE, 2009).

Em javalis, *B. suis* pode causar epididimite e orquite. No aparelho reprodutivo desses animais, foi observado inchaços e abscessos nos testículos e atrofia durante os estágios finais da doença. Javalis considerados assintomáticos podem excretar *B. suis* no sêmen sem qualquer anormalidade aparente nos órgãos sexuais ou que leve a apresentar interferência na atividade sexual (OIE, 2009). Em ambos os sexos pode ocorrer inchaço nas articulações acompanhado por incoordenação motora. A descarga vaginal é muitas vezes mínima em porcos que abortam (ANON, 2007).

4.4 Brucelose em animais domésticos

A brucelose é uma das doenças infecciosas de maior impacto econômico negativo na cadeia produtiva da carne e do leite, devido aos prejuízos causados em consequência dos distúrbios reprodutivos ocasionados nos animais, com consequente diminuição da produção do rebanho.

A brucelose nos animais domésticos é de importância regulamentar, devido à capacidade de *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis* em infectar pessoas e causar a doença clínica. No Brasil a brucelose bovina é endêmica, sendo observado uma prevalência de 4% na região Sul, 7,5 % na região Sudeste, 6,8 % na região Centro-Oeste, 2,0 % na região Nordeste e 4,1% na região Norte (POESTER, 2002).

Brucella suis ocorre mais frequentemente em pessoas que manuseiam porcos em suinoculturas ou matadouros e *B. canis* tende a ocorrer apenas em pessoas que lidam com cães, sendo necessário um contato próximo e constante para ocorrer transmissão. Casos de infecção humana adquiridos acidentalmente em laboratórios e naturalmente em indivíduos que trabalham em canis foram registrados (ACHA; SYFRES, 1989).

A brucelose em equinos é incomum, mas constitui uma fonte de infecção para outras espécies domésticas e, inclusive, para o homem (RADOSTITS et al., 2007) resultante da coabitação dos equinos com outras espécies domésticas, em especial bovinos, bubalinos e suínos, visto que os equinos compartilham da infecção preferencialmente por *B. abortus* (ACHA; SZYFRES 2003). Em ovinos e caprinos a doença não se apresenta com impacto no Brasil, devido ao fato da *B. melitensis* não estar presente no país. No Rio Grande do Sul uma atenção maior tem sido dada a *B. ovis*, devido a grande quantidade de ovelhas presente na região (POESTER, 2002).

4.5 *Brucella* spp. nos reservatórios silvestres

Um dos aspectos da epidemiologia da brucelose são a ocorrência e identificação de hospedeiros mamíferos suscetíveis a este agente, que podem dispersar e manter a *Brucella* spp. dentro das populações; pois várias espécies de *Brucella* já foram detectadas em animais silvestres, o que pode tornar-se uma grave ameaça aumentando a possibilidade de disseminação e perpetuação do agente para outros animais e para a população humana.

Diversos estudos têm tentado estabelecer a importância de tais espécies em áreas endêmicas ou em áreas de re-emergência da doença (MATHIAS et al., 1999; PAPPAS; PAPADIMITRIOUS, 2007). Embora, no Brasil, poucos estudos tenham sido conduzidos em relação à fauna silvestre afetada pela brucelose, Mayor et al. (2006) relataram, entre outras doenças diagnosticadas, a presença de 4,9% de animais positivos para *Brucella* spp. entre suínos silvestres na região próxima a Belém do Pará, na floresta Amazônica. Nesta região predomina a pecuária como principal atividade econômica. Por sua vez, no estado de São Paulo, Nava (2008) encontrou sete amostras reativas à prova do AAT em 61 porcos e queixadas silvestres.

Em diversos países, foi relatada a importância de espécies silvestres como reservatórios na epidemiologia da brucelose, como já constatada nos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e também na África. As espécies *B. abortus* e *B. suis* já foram isoladas de uma grande variedade de animais silvestres, como o bisão (*Bison bison*), cervo (*Cervus elaphus*), porco silvestre (*Sus scrofa*), javali (*Sus scrofa*), raposa (*Vulpes vulpes*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), renas (*Rangifer tarandus tarandus*) (GODFROID, 2002).

Registros de infecção por *B. suis* já foram encontrados em raposas árticas e lobos que podem ter contraído a infecção de renas, cães e roedores (OIE, 2011); assim como bovinos e equinos podem ser infectados por coabitação ou interação com suínos infectados (CVETINIC et al., 2005).

Vale ressaltar que relatos de *Brucella melitensis* nunca ocorreram no Brasil, e de modo geral, a sua ocorrência é raramente reportada na vida silvestre. Alguns casos foram descritos por Ferroglio et al. (1998) e Garin-Bastuji et al. (1990) em “alpine ibex” (*Capra ibex*) na Itália e na França em “chamois” (*Rupica prarupicapra*), respectivamente.

Nos Estados Unidos, por meio do Departamento da Agricultura (USDA) e pelo Serviço de Inspeção Sanitária (APHIS), esforços estão sendo realizados no sentido de

eliminar a brucelose em bovinos e suínos (STOFFREGEN et al., 2007) baseando na realização de testes sorológicos com eliminação dos focos sororreativos. Um foco conhecido de infecção por *B. abortus* acometando em alces e bisões foi observado no Parque Nacional Yellowstone, em 1917, sendo que em 1934 foi implementado um programa para a erradicação dessa enfermidade (RHYAN et al., 2009).

Vários países estão desenvolvendo programas de erradicação da brucelose e/ou obtendo sucesso no controle da enfermidade, uma vez que diversos animais silvestres como bisões, cervídeos, javalis, alces têm sido descritos como reservatórios de *B. abortus* (OLSEN, 2010). Os programas de regulamentação têm sido muito eficazes na redução ou eliminação da prevalência de doenças específicas nos animais domésticos, mas o alastramento da doença dos animais domésticos para a vida silvestre tem permitido a criação de novos hospedeiros. O fato acima assume grande importância haja vista a crescente aproximação e contato do homem com animais silvestres, assim como com animais domésticos (DAVIS, 1990).

4.5.1 Brucelose em suínos silvestres

A ocorrência de infecção em suínos domésticos e silvestres são predominantemente causados *B. suis* biovars 1, 2 e 3, e ocasionalmente por *B. abortus* e *B. melitensis* (ANON, 2007). Apesar de *B. suis* estar distribuída mundialmente, a prevalência em porcos domésticos é baixa, com exceção do sudoeste da Ásia e América do Sul (GODFROID, 2002). A enfermidade foi erradicada por décadas na população de porcos domésticos, mas ainda está restrita aos suínos silvestres nos Estados Unidos, Austrália e na Europa (GODFROID, 2002).

A criação de reservatórios destes agentes infecciosos na vida silvestre tem complicado os esforços no controle, permitindo a retransmissão para os animais domésticos e a persistência de *Brucella* spp. nessa população (OLSEN; STOFFREGEN, 2005). Existem relatos de casos de bovinos (OLSEN; TANTUN, 2010) e suínos domésticos (CORN et al., 2009) que contraíram a infecção após contato com porcos silvestres infectados com *Brucella* spp. Nesse caso, os animais silvestres atuaram como fonte de infecção para outros animais que partilhavam do mesmo local de forrageio (EBANI et al., 2003; OLSEN; STOFFREGEN, 2005).

Outra situação que vem ocorrendo ao longo das últimas décadas é o aumento da disseminação de brucelose, aliado principalmente a prática de caça, realizado em alguns países. Nos Estados Unidos, essa atividade tem permitido a dispersão e distribuição de

suínos silvestres infectados com *B. suis* em áreas antes consideradas livres da enfermidade (RHYAN, 2000), permitindo maior interação e maior transmissão de doenças entre os suínos silvestres, animais domésticos e silvestres e também para seres humanos (CORN et al., 2009). Segundo Campbell e Long (2009), têm sido discutido se cães deveriam ser usados ou não durante as capturas, devido à alteração do movimento ou dispersão dos suínos. No sul da França, determinou-se que os cães de caça são a maior causa de distribuição dos suínos, ocasionando o aumento na distância de movimentação dos porcos, que contribui também na dispersão de doenças.

Alguns países da Ásia, América Latina, Oceania e Europa Central apresentaram diversos casos confirmados de brucelose em javalis (*Sus scrofa*) (CVETNIC et al., 2004) e em pelo menos 16 estados americanos já houve relatos de brucelose nessa população (GRESHAM et al., 2003; WYCOFF et al., 2009). Uma grande preocupação nos Estados Unidos é a possibilidade de que suínos silvestres estejam introduzindo ou reintroduzindo doenças exóticas ou erradicadas em criações suínas livres de doenças. Essa preocupação existe, pois parte das criações comerciais de suínos nesse país, ainda é feita em “fundos de quintal” e essa prática favorece com que suínos domésticos e silvestres entrem em contato direto ou indireto, por meio de fômites e aerossóis deixados no ambiente. Estudos mostraram que o contato entre suínos silvestres e domésticos ocorreram predominantemente à noite, quando há menor atividade humana (WYCOFF et al., 2009).

Wyckoff et al. (2009) sugeriram que os alimentos presentes nas criações de suínos domésticos, nos Estados Unidos, podem não ser um estímulo suficiente para atrair suínos silvestres. Os autores observaram que parece existir uma preferência pelos suínos silvestres em se aproximar de instalações que continham fêmeas suínas, o que pode significar que machos estejam em busca fêmeas para acasalar ou que isto simplesmente seja característica do comportamento sociável da espécie. Entretanto, o grau de aproximação, nas diferentes regiões, pode variar de acordo com a disponibilidade de alimentos encontrado nos ambientes.

Considerando o aumento na distribuição das populações de suínos silvestres em muitas regiões e a presença de soropositivos em muitos rebanhos (LEISER et al., 2013), os porcos silvestres podem ser considerados como fonte de infecção para suínos domésticos, gado e os seres humanos. Como, por exemplo, casos de brucelose humana na Austrália e nos Estados Unidos que ocorreram após o contato ou consumo de animais infectados com *B. suis* (CDC, 2009).

4.6 Diagnóstico da brucelose

A brucelose animal pode ser diagnosticada por diferentes métodos, usados isoladamente ou em conjunto. Entre eles destacam-se o diagnóstico clínico, baseado nos sinais clínicos de aborto, nascimento de bezerras fracas e esterilidade de fêmeas e machos; dados epidemiológicos baseados na história dos rebanhos; isolamento e identificação do agente etiológico e ainda pela demonstração de anticorpos nos fluídos orgânicos (POESTER et al., 2005).

4.6.1 Diagnóstico bacteriológico

O isolamento e a identificação do agente etiológico é um método inequívoco de diagnóstico da brucelose. É considerado como teste padrão-ouro, devido a sua alta especificidade e capacidade de identificar diferentes espécies e biovars do agente (LAGE et al., 2008).

Diversos trabalhos descrevem a sua utilização para o diagnóstico de *Brucella* spp. em animais silvestres, como Cvetinic et al. (2004) que selecionaram de forma aleatória 106 de 514 amostras de tecidos de javalis (*S. scrofa*). Essas amostras foram colhidas para realização de exames bacteriológicos, sendo 67 amostras de testículos, 24 amostras de úteros gravídicos e 15 amostras de úteros de fêmeas que não estavam prenhes. Os autores identificaram *B. suis* biovar 2 em 18 (17,0%) dos 106 javalis examinados.

Hinic et al. (2009) também realizaram o isolamento de 53 amostras de tecido, como baço, útero, testículo, rim, bexiga, pênis, prepúcio e placenta de javalis (*S. scrofa*). *Brucella* spp. foi encontrada a partir de amostras de tecido de 5 (9,4%) dos 53 animais. De acordo com o método de isolamento bacteriano, a prevalência mais elevada foi encontrada em tecidos dos órgãos reprodutores (três isolados de um útero, nas glândulas sexuais acessórias, uma no prepúcio).

4.6.2 Diagnóstico sorológico

A quantidade de testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico de brucelose é bastante ampla, permitindo a pesquisa de anticorpos presentes em diversos fluidos corporais como leite, soro sanguíneo, muco vaginal, sêmem e leite (POESTER et al., 2005).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) definiu para animais domésticos os seguintes testes: Antígeno

Acidificado Tamponado (AAT), Anel em Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC). Os dois primeiros como testes de triagem e os dois últimos como confirmatórios (BRASIL, 2006). Um dos testes empregados no PNCEBT é o AAT que é um teste qualitativo rápido, prático, de custo reduzido e de boa sensibilidade, possui um pH de $3,65 \pm 0,05$ que previne a aglutinação pela IgM e estimula a aglutinação pela IgG1 reduzindo reações não específicas (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Provas com antígenos acidificados tamponados têm sido bastante utilizadas como teste de triagem em bovinos. São provas muito úteis, mas tendem a ser demasiadamente sensíveis, especialmente em animais vacinados com S19, apresentando altas taxas de animais falso-positivos. Dessa forma, animais reagentes no AAT devem ser confirmados em outros testes, como o 2 - Mercaptoetanol (POESTER et al., 2005).

A sorologia para brucelose nos animais silvestres emprega, normalmente, o mesmo antígeno utilizado nos testes dos animais domésticos, pois os antígenos de *Brucella* spp. estão associados com o lipopolissacarídeo (LPS), e são em grande extensão compartilhada por todos os biovars de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* (ALTON et al., 1988).

Por conta da presença do LPS na superfície da célula bacteriana, podem ocorrer reações falso-positivas entre as espécies de *Brucella* e outras bactérias Gram-negativas, tais como a *Yersinia enterocolitica* O: 9, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli*, O: 157 e *Salmonella urbana* grupo N (MUNHOZ et al., 2005). Outro fator que pode levar a reações cruzadas é a vacinação com S19 em bovinos após a idade recomendada (BRASIL, 2006).

Resultados falso-negativos também podem ser observados no diagnóstico sorológico da brucelose. Essas situações ocorrem, pois a resposta do anticorpo é dependente da fase de infecção e também do momento em que é feita a coleta da amostra (CARPENTER, 1975). Como por exemplo, no trabalho publicado de Leal-Klevezas et al., (2000), onde afirmaram que quantidades detectáveis de anticorpos não foram registrados nos primeiros 12 - 16 dias após inoculação artificial de cabras com *B. abortus*. Por outro lado, quando a doença torna-se crônica, os títulos de anticorpos podem cair para níveis indetectáveis, como o que foi observado no experimento realizado com lobos (*C. lupus*), após três meses da infecção por *B. abortus* (Tessaro; Forbes, 2004).

Toda essa situação representa um grande problema para o diagnóstico da brucelose quando se realiza testes sorológicos, pois muitos desses testes não foram validados para animais silvestres, podendo não representar as mesmas propriedades diagnósticas. Contudo várias investigações sorológicas têm sido realizadas em diferentes espécies silvestres, a fim de classificar as espécies ou indivíduos como expostos ou não expostos a *Brucella* spp. (Godfroid, 2002).

Wycoff et al. (2009), realizaram recapturas de suínos silvestres para determinar se o estado da doença mudou ao longo do tempo nesses indivíduos. Os autores verificaram que em algumas amostras ocorreu a soroconversão, o que pode ser devido a uma infecção latente ou uma nova exposição ao patógeno. Outro dado observado foi de uma amostra inicialmente negativa no teste sorológico que soroconverteu e em sua quarta amostragem foi considerada, novamente, negativa no teste.

Levantamentos sorológicos para *Brucella* spp. em suínos silvestres já foi detectada em pelo menos 16 estados americanos (LEISER et al., 2013), sendo que a porcentagem de suínos silvestres soropositivos variou de estado para estado, bem como ao longo do tempo, variando de 0,3% (1/321) a 48,8% (39/80) (HARTIN et al., 2007; STOFFREGEN et al., 2007). Essa variação pode ser devido a diferenças do tamanho amostral coletado para cada estudo ou a questões metodológicas aplicadas nos diferentes estudos (WYCOFF et al., 2009). Portanto, os dados sorológicos obtidos devem ser interpretados e analisados com cautela (LEISER et al., 2013).

Nesse sentido, foi realizado na Suíça um estudo com 229 soros de javalis empregando os testes do AAT e cELISA, onde 21 desses animais foram considerados positivos em ambos os testes sorológicos (WU et al., 2011). Os autores reforçam a necessidade de se combinar os resultados dos dois testes para revelar o número total de javalis que apresentaram anticorpos reagentes contra *Brucella* spp. A combinação realizada nesse estudo permitiu, segundo os autores, determinar uma prevalência de 35,8% para esses animais em questão (WU et al., 2011).

No estudo realizado por WU et al. (2011) em javalis silvestres na Suíça, o teste sorológico mais sensível foi o AAT do que o cELISA, onde discutiram que a menor especificidade observada no AAT deve-se, principalmente, a reações cruzadas com *Y. enterocolitica* sorotipo O: 9, (WU et al., 2011). No entanto, segundo Fredriksson-Ahomaa et al, (2009) infecções com *Y. enterocolitica* são raras em javalis suíços. Javalis adultos apresentam frequentemente mais anticorpos positivos do que animais jovens como foi

relatado (LEUENBERGER et al., 2007), provavelmente devido ao maior tempo (WYCKOFF et al., 2009) e maior exposição desde *B. suis* (CVETNIC et al., de 2004).

Em algumas áreas onde porcos silvestres compartilham do mesmo pasto com outros animais, foi possível encontrar *Brucella* spp. infectando essas populações. Essa situação foi observada na Croácia, em uma região onde porcos coabitam com outras espécies de animais domésticos; sendo que na região leste desse país os resultados soropositivos devem-se às grandes fazendas comerciais que criam porcos soltos no ambiente (CVETNIC et al., 2005).

Em uma província da Croácia, Vukovarsko-srijemska, apresentou um elevado número de porcos domésticos e javalis silvestres soropositivos, diferente de Osječko-baranjska que demonstrou baixa porcentagem de porcos soropositivos, mesmo havendo no mesmo local um elevado percentual de javalis soropositivos. Essa discrepância pode estar relacionada com o contato entre porcos e javalis infectados e também com o número de animais testados, pois em Vukovarsko-srijemska, os porcos são geralmente criados ao ar livre e acabam entrando em contato com animais domésticos e silvestres. Por outro lado, em Osječko-baranjska a forma da criação de porcos domésticos é intensiva e poucos porcos estão soltos no ambiente (CVETNIC et al., 2005).

Na Carolina do Norte, em 2004, foi realizada uma triagem para detectar anticorpos contra *Brucella* spp. em suínos silvestres caçados. Nenhum dos animais testados foram considerados positivos nos testes aplicados até a segunda temporada de caça, quando 6/27 dos animais testados foram considerados positivos. Os dados obtidos sugeriram uma introdução recente de *Brucella* spp. nessa população em questão. Nos seguintes períodos de caça, foi observado a prevalência de 8% (3/36) e, durante o período de 3 anos, 9% (9/98) dos suínos silvestres testados apresentavam anticorpos para *B. suis* (SANDFOSS et al., 2012).

Acredita-se que suínos silvestres estão se movimentando em torno da Carolina do Norte por conta da caça recreativa, entrando, provavelmente, em contato com porcos da Carolina do Sul, pois segundo CORN et al. (2009) o estado da Carolina do Sul apresenta uma grande população de porcos silvestres que rotineiramente são detectados com anticorpos contra *B. suis*.

Os resultados sorológicos obtidos no estudo de Hinic et al. (2009) com javalis silvestres, levaram os autores a concluir que esses animais provavelmente estavam com infecção aguda ou cronicamente infectados, apresentando níveis de anticorpos abaixo do limite detectável. Os autores também comparam os resultados da sorologia

com o teste da qPCR (PCR em tempo real) e tentam explicar a discrepância dos resultados encontrados. Discutem que o teste molecular detectou infecção em javalis sorologicamente negativos devido a PCR detectar diretamente o DNA do organismo e a sorologia ser dependente dos títulos variáveis de anticorpos em diferentes fases da doença (LEAL-KLEVEZAS et al., 2000). Por outro lado, no trabalho de Hinic et al. (2009), muitas amostras negativas na qPCR foram sorologicamente positivas, o que pode ser devido a uma falta de sensibilidade da técnica de PCR em tempo real ou ao fato de falso-positivos na sorologia.

Em alguns estudos, o caititu (*Tayassu tajacu*) quando submetido a testes sorológicos, tem sido considerado soronegativos mesmo quando estes compartilham algumas áreas com suínos silvestres (MAYOUR et al., 2006, CORN et al., 1987). Essa situação não está muito clara, considerando o fato que os porcos silvestres podem transmitir *Brucella* spp. para outros animais, como o gado doméstico e a veados (COOPER et al., 2010).

Para Ilhan et al. (2007), a maioria dos testes sorológicos não apresentam sensibilidade absoluta, devendo-se, normalmente, associar a várias técnicas para aumentar o número de animais detectados, pois animais recentemente infectados ou com infecção crônica podem não ser detectados por essas técnicas (GODFROID, 2002). A presença de anticorpos sugere que houve a exposição a bactérias, mas não significa, necessariamente, que os animais estejam infectados no momento da amostragem.

4.6.3 Identificação de espécies de *Brucella* por PCR e qPCR

A técnica de amplificação por meio da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem sido empregada por diversos autores para identificação e detecção de *Brucella* spp. (BRICKER; HALLING 1994; BRICKER; HALLING 1995; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; LEAL-KLEVEZAS et al., 2000; EWALT; BRICKER, 2000; SANGARI et al., 2000; HINIC et al., 2008; HINIC et al., 2009). Esta técnica demonstra potencialidade para detecção e diferenciação de bactérias pertencentes ao gênero, no entanto, sua utilização a partir tecidos e líquidos biológicos com baixo número de bactérias mostra menor sensibilidade, o que pode estar associada a presença de inibidores da enzima polimerase ou à técnica de extração de DNA (DA COSTA et al., 1996).

A maioria dos genes utilizados para o desenho de oligonucleotídeos para a utilização na técnica de PCR tem sido os encontrados na proteína de membrana externa BCPS31 (*omp* 31) (DA COSTA et al., 1996), a sequência de inserção (IS) 711

(BRICKER; HALLING, 1994; BRICKER; HALLING, 1995) e o gene de metabolização do eritritol (SANGARI et al., 2000). Para detecção da espécie são utilizados genes específicos para identificar e diferenciar *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* (HINIC et al., 2008; HINIC et al., 2009).

A localização genômica da região IS6501 (ou IS711) é encontrada somente no genoma de *Brucella* spp., variando no número de cópias e localização genômica entre as espécies (HALLING et al., 1993). IS711 é observado abaixo da região codificante do gene que codifica a proteína BCPS 31 de *B. ovis*, entretanto essa região está ausente abaixo desse gene em outras espécies de *Brucella* (HALLING; ZEHR, 1990; OUAHARIUM et al., 1993). Os oligonucleotídeos sintetizados a partir de sequências repetitivas podem caracterizar um gênero, espécie e mesmo amostras diferentes de uma mesma espécie.

A identificação molecular da amostra vacinal S19 está baseada em um gene ligado ao catabolismo do eritritol (*ery*) e este tem sido descrito na literatura como um importante marcador na diferenciação de S19 das amostras de campo (EWALT; BRICKER, 2000). As espécies pertencentes ao gênero *Brucella*, com exceção da amostra vacinal S19, utilizam preferencialmente a via metabólica do eritritol, promovendo o crescimento das amostras em meio ricos na presença deste álcool. Sangari et al. (2000) relataram a análise de restrição da região eri da amostra de campo *B. abortus* 2308 e amostra vacinal S19, revelando uma sequência deletada de cerca de 702 nucleotídeos na S19. A partir dessa análise, os autores descreveram um método de PCR para diferenciação da amostra S19 para outros isolados de *B. abortus*, utilizando dois oligonucleotídeos concebidos a partir da sequência de DNA de *B. abortus* 2308, uma em cada lado das extremidades da deleção encontrada em S19. Estes iniciadores amplificam 1.063 pares de bases (pb) a partir da amostra de *B. abortus* 2308 e um fragmento de 361 pb a partir da amostra S19.

Trabalhos têm sido realizados a fim de demonstrar a presença de *Brucella* spp. nos animais silvestres, utilizando a PCR convencional. Cvetnic et al. (2004) realizou PCR convencional utilizando os oligonucleotídeos BCPS-31 e IS711 em 18 isolados de amostras de javalis (*Sus scrofa*), onde foi possível confirmar que os isolados pertenciam a *Brucella* spp. Stofregen et al. (2007) utilizou a técnica de PCR multiplex para identificar *B. suis*, *B. abortus* RB51 e *B. abortus* S19 a partir de amostras colhidas de suínos silvestres da Carolina do Sul, Estados Unidos. O ensaio revelou que não era só *B. suis* e RB51 que estavam presente na população, mas também demonstrou a ocorrência

de *B. abortus* amostra de campo e S19. No Pantanal Sul-Mato-Grossense foi descrito em veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) a presença de *Brucella* spp. utilizando a PCR convencional com o oligonucleotídeo gênero-específico denominado *virB5* (ELISEI et al., 2010).

A identificação das espécies de *Brucella* pode ser realizada com o emprego de oligonucleotídeos específicos como o descrito por Hinic et al. (2008). Estes autores basearam-se nos *locis* genéticos para diferenciarem as espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. Os oligonucleotídeos utilizados nesse experimento possuem a característica de serem utilizados tanto na PCR convencional quanto na PCR tempo real.

A PCR em Tempo Real é extremamente sensível e proporciona mais especificidade para a detecção de microorganismos, além de ser uma alternativa promissora para a identificação em menor tempo a de *Brucella* spp.

Diversos trabalhos vêm sendo realizado para detecção de *Brucella* spp. a partir de diferentes amostras clínicas, como o publicado por Queipo-Ortuño et al. (2006), que avaliaram o rendimento da qPCR para o diagnóstico rápido de *Brucella* spp. em humanos, a partir de amostras de urina, utilizando o oligonucleotídeo gênero-específico BCSP31. Empregando a qPCR, os autores obtiveram resultados disponíveis em quatro horas, de nove/ dez (90%) pacientes infectados com *Brucella*; enquanto que o tempo médio para a obtenção dos resultados de cultura de sangue foi de 5,8 dias. Os autores reforçaram que a técnica pode ser uma ferramenta prática e útil para o diagnóstico rápido de brucelose em humanos.

Debeaumont et al. (2005) realizaram qPCR a partir de amostras de soro sanguíneo para o diagnóstico rápido de brucelose em humanos, empregando o oligonucleotídeo gênero-específico BCSP31. Entre os 17 pacientes testados, 11 soros deram um sinal positivo de amplificação, correspondendo a uma sensibilidade de 64,7%, indicando que o teste pode auxiliar na confirmação definitiva dos casos de brucelose, quando as culturas de *Brucella* permanecerem estéreis.

Bounaadja et al. (2009) compararam a qPCR com a PCR convencional, utilizando os mesmos genes. Em sua pesquisa, três genes de *Brucella*, incluindo IS711, BCSP31 e *per* genes foram avaliados em ambas as técnicas. Concluiu-se que os ensaios de PCR em tempo real foram de fácil execução, produzem resultados mais rápidos do que a PCR convencional o que reduz o risco de contaminação. Doosti e Dehkord (2011) empregaram a qPCR com TaqMan[®] para identificar *Brucella* spp. e diferenciar *B.*

abortus e *B. melitensis* em 425 amostras de sangue de bovinos no sudoeste do Irã. Os resultados mostraram que 127 (29,88%) amostras foram positivas para *Brucella* spp. por PCR em tempo real, sendo 9 para *B. melitensis*, 69 para *B. abortus* e 5 para ambas as bactérias.

Estes estudos mostraram que a técnica de PCR em tempo real é uma técnica sensível, específica e mais rápida do que os métodos sorológicos e de PCR convencional. Entretanto, nem todos os autores concordam com este princípio, como O'Leary et al. (2006), que realizou a detecção de *B. abortus*, por meio da qPCR com o oligonucleotídeo IS711, a partir do sangue, leite e de amostras de nódulos linfáticos de vacas naturalmente infectadas. Seus resultados demonstraram que por meio dessa técnica não foi possível detectar *B. abortus* a partir das amostras de sangue, mas foi detectada a partir da cultura do leite e do tecido linfático, pelos mesmos métodos. Os autores perceberam que não houve diferenças entre a qPCR e método bacteriológico, para detecção de *B. abortus* em amostras clínicas.

Poucos trabalhos empregaram a qPCR utilizando amostras de animais silvestres para detecção de brucelose. Hinic et al. (2009) realizou qPCR utilizando o oligonucleotídeo gênero-específico IS711 em 199 amostras de sangue de javalis silvestres (*S. scrofa*), provenientes da Suíça, os resultados demonstraram que 27 (13,6%) animais foram considerados positivos para *Brucella* spp. Os autores também realizaram a qPCR a partir do isolamento de 53 amostras de tecidos (baço, testículo, rim, bexiga, pênis, prepúcio e placenta) com o oligonucleotídeo IS711 a fim de detectar *Brucella* spp. nessas amostras. O procedimento permitiu detectar 14 javalis infectados, além de detectar, adicionalmente, nove (17%) de animais infectados, que eram negativos pelo método de isolamento bacteriano.

Com isso, o presente trabalho tem como objetivo geral realizar a identificação molecular de *Brucella* spp. em porcos-monteiros (*Sus scrofa*) provenientes do Pantanal Sul-Mato-Grossense.

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux.: **Office International Epizooties**, v. 17, p.26-27, 1989.

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

ALMEIDA, I. L.; ABREU, U. G. P.; LOUREIRO, J. M. F.; COMASTRI FILHO, J. A. **Introdução de tecnologias na criação de bovinos de corte no Pantanal - sub-região dos Paiguás.** Corumbá: EMBRAPA-CPAP, Circular técnica, p. 50, 1996.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory.** Paris: INRA, 1988.

ANON. **Porcine and rangeland brucellosis: *Brucella suis*.** Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, Ames, 1-6, 2007.

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira.** São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2012.

BISPO, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa,** Oxford University Press: Cape Town, v. 2, p. 1053-1066, 1994.

BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock.** Austin: Texas A&M University Press, College station, v. 2, p. 1053-1066, 1994.

BRASIL. 2006. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCBET.** Brasília, DF: MAPA, Secretária de Defesa Animal.

BRICKER, B. J. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 433-434, 2002.

BRICKER, B. J.; HALLING. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2660-2666, 1994.

BRICKER, B. J.; HALLING. J. Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1640-1642, 1995.

BOUNAADJA, L.; ALBERT, D.; CHE NAIS, B.; HENAULT, S.; ZYGMUNT, M. S.; POLIAK, S.; GARIN-BASTUJI, B. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 156-164, 2009.

CAVALLÉRO J. C. M. Enfermidades causadoras de aborto: brucelose. In: LEMOS, R.A.A. (ed.) **Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico.** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 1998.

CARPENTER, P. L. **Immunology and Serology.** Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company. 1975

CAMPBELL, T. A.; LONG, D. B. Feral swine damage and damage management in forested ecosystems. **Forest Ecology and Management**, v. 257, p. 2319-2326, 2009

CAVALLÉRO, J. C. M. Enfermidades causadoras de aborto: Brucelose. In: LEMOS, R. A. A. (Ed.). **Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: Reconhecimento e diagnóstico**. Campo Grande: UFMS, p. 536, 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). ***Brucella suis* infection associated with feral swine hunting - three states, 2007-2008**. Weekly Report Morbidity and Mortality, Atlanta GA, 2009.

CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 46-55, 2009.

CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. Genus *Brucella*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore: Williams and Wilkins, v. 1, p. 377-388, 1984.

COOPER, S.M.; SCOTT, H.M.; DE LA GARZA, G.R.; DECK, A.L.; CATHEY, J.C. Distribution and interspecies contact of feral swine and cattle on rangeland in South Texas: implications for disease transmission. **Journal Wildlife Diseases**, v. 46, p. 152-164, 2010.

CORN, J. L.; CUMBEE, J. C.; BARFOOT, R.; ERICKSON, G. A. Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production. **Journal Wildlife Disease**, v. 45, p. 713-21, 2009.

CORN, J. L.; RAYMOND, M. L.; GENE, A. E.; MURPHY, C. D. Serologic survey for evidence of exposure to vesicular stomatitis vírus, *Pseudorabies vírus*, brucellosis and leptospirosis in a collared peccaries from Arizona. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, p. 551-557, 1987.

CORNER, L. A. L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 303-312, 2006.

CVETNIC, Z.; TONCIC, J.; SPICIC, S.; LOJKIC, M.; TERZIC, S.; JEMERSIC, L.; HUMSKI, A.; CURIC, S.; MITAK, M.; HABRUN, B.; BRSTILO, M.; OCEPEK, M.; KRT, B. Brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in the Republic of Croatia. **Veterinary Medicine – Czec.** v. 4, p. 115-122, 2004.

CVETNIC, Z.; SPICIC, S.; CURIC, S.; JUKIĆ, B.; LOJKIC, M.; ALBERT, D.; HIÉBAUDM, T.; GARIN-BASTUJI, B. Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. **Veterinary Record**, v. 156, p. 584-585, 2005.

DA COSTA, M.; GUILLOU, J. P.; GARIN-BASTUJI, B.; THIÉBAUD, M.; DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 267–275, 1996.

DAVIS, D. S. **Brucelose em animais selvagens**. In: Nielson, K.; Duncan, J. Brucelose. CRC Press: Boca Raton, Florida, 321-3341990.

DEBEAUMONT, C.; FALCONNET, P. A.; MAURIN, M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious and Diseases**, v. 24, p. 842-845, 2005.

DEEM, S. L.; NOSS, A. J.; VILLARROEL, R.; UHART, M. M.; KARE, W. B. Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Gran Chaco, Bolívia. **Journal Wildlife Disease**, v. 40, p. 92-98, 2004.

DESBIEZ, A. L. J.; KEUROGHIAN, A.; PIOVEZAN, U.; BODMER, R. E. Invasive species and bushmeat hunting contributing to wildlife conservation: the case of feral pigs in a Neotropical wetland. **Oryx**, v. 45, p. 78-83, 2011.

DETILLUX, P. G.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 2320-2328, 1990.

DOOSTI, A.; GHASEMI DEHKORDI, P. Application of Real-Time PCR for identification and differentiation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in cattle. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 14, p. 109-115, 2011.

EBANI, V. V.; CERRI, D.; POLI, A.; ANDREANI, E. Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. **Journal Wildlife Disease**, v.39, p. 718–722, 2003.

ELISEI, C.; PELLEGRIN, A.; TOMAS, W. M.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; FUNES-HUACCA, M. E.; ROSINHA, G. M. S. Evidência molecular de *Brucella* sp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 503-509, 2010.

ESSELIN, P. M. **A pecuária no processo de ocupação e desenvolvimento econômico do Pantanal Sul-Mato-Grossense (1830-1910)**. 2003. Tese Doutorado - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária Pantanal (Corumbá, MS). Plano diretor do Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal- CPAP. EMBRAPA-CPAP, Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 41, 1993.

EWALT, D. R.; BRICKER, B. J. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. **Journal Clinical Microbiology**, n. 38, p. 3085-3086, 2000.

FERROGLIO, E.; TOLARI, F.; BOLLO, E.; BASSANO, B. First isolation of *Brucella melitensis* from alpine ibex. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, p. 400–402, 1998.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2688–2693, 2007.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; WACHECK, S.; KOENIG M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 199–202, 2009.

GARIN-BASTUJI, B.; OUDAR, J.; RICHARD, Y.; GASTELLU, J. Isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the Southern Fresh Alps. **Journal Wildlife Diseases**, v. 26, p.116-118, 1990.

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; FILHO, M. M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres em estado feral da região da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural**, v. 34, p. 165-169, 2003.

GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. **Revue Scientifique et Technique**, v. 21, p. 277–286, 2002.

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Croatian Medical Journal**, v. 51, n. 4, p. 296-305, 2010.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 281-297, 2002.

GRESHAM, C. S.; GRESHAM, C. A.; DUFFY, M. J. Increased prevalence of *B. suis* and *Pseudorabies virus* antibodies in adults of an isolated feral swine population in coastal South Carolina. **Journal Wildlife Disease**, v. 38, p. 653–656, 2002.

HALLING, S. M.; ZEHR, E. Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 6637-6640, 1990.

HALLING, S. M.; TATUM, F. M.; BRICKER, B. J. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. **Gene**, v. 133, p. 123-127, 1993.

HAMPTON, J.; SPENCER, P. B. S.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R. C. A. Prevalence of zoonotic pathogens from feral pigs in major public drinking water catchments in Western Australia. **EcoHealth**, v. 3, p. 103-108, 2006.

HARRIS, M. B.; TOMAS, W. M.; MOURÃO, G.; SILVA, C. J.; GUIMARÃES, E.; SONODA, F.; FACHIM, E. Desafios para proteger o Pantanal brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. **Megadiversidade**, v. 1, p. 156-165, 2005.

HARTIN, R. E.; RHYAN, M. R.; Campbell, T. A. Distribution and disease prevalence of feral hogs in Missouri. **Human–Wildlife Conflicts**, v. 1, p. 186–191, 2007.

HINIC, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; CVETNIC, Z.; MAKAYA, P. V.; FREY, J.; ABRIL, C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. **Journal Microbiology Methods**, v. 75, p. 375-378, 2008.

HINIC, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; HOLUB, M.; MISEREZ, R.; ABRIL, C. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. **BMC Veterinary Research**, v. 5, p. 22, 2009.

ILHAN, Z.; AKSAKAL, A.; EKIN, I. H.; GÜLHAN, T.; SOLMAZ, H.; ERDENLIG, S. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 301-306, 2007.

ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A.; BERNARDI, F.; NASCIMENTO, A. A.; LABRUNA, M. B.; ARANTES, I. G. Evidência sorológica de brucelose e leptospirose e parasitismo por ixodídeos em animais silvestres do pantanal sul-mato-grossense. **Ars Veterinária**, v. 14, p. 302-310, 1998.

KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host pathogen interaction in brucellosis current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 65-78, 2003.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXAO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, p. 202-212, 2008.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTINEZ-VÁSQUES, I. O. GARCÍA-CATU, J.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, P. Single step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of animals. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, p. 3087-3090, 1995.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTINEZ-VÁSQUES, I. O. GARCÍA-CATU, J.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, P. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 91-97, 2000.

LEISER, O. P.; CORN, J. L.; SCHMIT, B. S.; KEIM, P. S.; FOSTER, J. T. Feral swine brucellosis in the United States and prospective genomic techniques for disease epidemiology. **Veterinary Microbiology**, v. 166, p. 1-10, 2013.

LEUENBERGER, R.; BOUJON, P.; THÜR, B.; MISEREZ, R.; GARIN-BASTUJI, B.; RÜFENACHT, J. STÄRK, K. D. C. Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. **Veterinary Record**, v. 160, p. 362-368, 2007.

LORD, V. R.; LORD, R. D. *Brucella suis* infection in collared peccaries in Venezuela. **Journal of Wildlife Disease**, v. 27, p. 477-481, 1991.

LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. New Zealand: The Invasive Species Specialist Group (ISSG), 2000. 12 p. Disponível em: Luiz Otávio Campos da Silva

MAURO, R. Estudos Faunísticos na Embrapa Pantanal. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, p. 175-185, 2002.

MATHIAS, L. A.; GIRIO, R. J. S.; DUARTE, J. M. B. Sero-survey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in Pampas Deer from Brazil. **Journal Wildlife Disease**, v. 35, p. 112–114, 1999.

MAYOR, P.; LE PENDU, Y.; GUIMARÃES, B. D. A.; SILVA, J. V.; TAVARES, H. L.; TELLO, M. A.; WASHINGTON, P.; LOPEZ-BEJAR, M. A.; FERRAN JORI, A.; A health evaluation in a colony of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 246-253, 2006.

MENEGHI, D. D. Wildlife, environment and (re)-emerging zoonoses, with special reference to sylvatic tick-borne zoonoses in North-western Italy. **Annali dell Istituto Superiore di Sanita**, v. 42, p.405-409, 2006.

METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W. C. Brucellosis. IN: BERAN, G. W.; STEELE, J. H. (Eds.). Handbook of zoonoses, CRC Press, Boca Raton, Fla, p. 9-39 1994.

MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MINHARRO, S.; LÔBO, J. R.; MÜLLER, E. E.; GONÇALVES, V. S. P; LAGE, A. P. Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT? **Leite Integral**, v.3, p. 44-55, 2008.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 209 –227, 2002.

MOURÃO, G. M.; COUTINHO, M. E.; MAURO, R. A.; TOMÁS, W. M.; MAGNUSSON, W. **Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco-monteiro), gado bovino e búfalos**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2002. MS. Plano diretor do Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal.

MUÑOZ, P. M.; MARÍN, C. M.; MONREAL, D.; GONZÁLEZ, D.; GARIN-BASTUJI, B.; DÍAZ, R.; MAINAR-JAIME, R. C.; MORIYÓN, I; BLASCO, J. M. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, p. 141-151. 2005,

MURI, A. F.; PIOVIZAN, U.; LIMA, T. N.; RIBEIRO, D. B.; MARTINS, F. I.; ORTIZ-MARTINÉZ, T. **Piletas**: água para o gado e para a fauna no Pantanal da Nhecolândia. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2007. (Comunicado Técnico, 59).

NAVA, A. F. D. Espécies Sentinelas para a Mata Atlântica: as consequências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema, São Paulo. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo. 2008.

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

O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 170-176, 2006.

OLIVER, W. L. R.; BRISBIN, I. L. Introduced and feral pigs: problems, policy, and priorities. In: OLIVER, W. L. R., (Ed.). **Pigs, peccaries and hippos**. International Union Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland, 1993.

OLSEN, S. C. Brucellosis in the United States: Role and significance of wildlife reservoirs. **Vaccine**, v. 28, p. 73-76, 2010.

OLSEN, S.; STOFFREGEN, W. S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, p. 915-928, 2005.

OLSEN, S.; TATUM, F. Bovine brucellosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, p. 18-27, 2010.

OUAHRANI, S.; MICHAUX, S.; WIDADA, J. S. BOURG, G.; TOURNEBIZE, R.; RAMUZ, M.; LIAUTARD, J. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp. Relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. **Journal of General Microbiology**, v. 1993, p. 3265-3273, 1993.

PAES, R. C. S.; RIBEIRO, O. C.; CARNEIRO MONTEIRO, L. A. R.; FIGUEIREDO, A. O.; NETO, A. A. C.; OLIVEIRA, J. M.; DA ROSA, G. O.; KEUROGLIAN, A.; PIOVEZAN, U.; HERRERA, H. M. Enfermidades de ocorrência no porco monteiro (*Sus scrofa*) no pantanal sul-mato-grossense, Brasil. Anais 35^a Conbravet, Gramado, RS, 2009. (Resumo).

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 29-31, 2007.

PAULIN, L. M. Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 239-249, 2003.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69 p. 105-112, 2002.

PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. M. H.; GUIMARÃES, P. H. S.; LAGE, A. P.; LEITE, R. C. Prevalência de brucelose bovina no Pantanal Mato-Grossense. In: 26° Congresso brasileiro de medicina veterinária, Campo Grande, 1999.

PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. M. H.; SERENO, J. R. B.; LAGE, A. P.; LEITE, R. C.; RAVAGLIA, E. Brucelose bovina no pantanal sul-mato-grossense: Dados preliminares. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 58, p.1-4, 2006.

PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V.; MEGE, J. L.; GORVEL, J. P. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 2387-2392, 1998.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55–62, 2002.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; LAGE, A. P. Diagnóstico da brucelose bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, p.13-29, 2005

QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; COLMENERO, J. D.; MUÑOZ, N.; BAEZA, G.; CLAVIJO, E.; MORATA, P. Rapid diagnosis of *Brucella* epididymo-orchitis by Real-Time polymerase chain reaction assay in urine samples. **Journal of Urology**, v. 176, p. 2290-2293, 2006.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 2156, 2007.

RHYAN, J. C. **Brucellosis in terrestrial wildlife and marine mammals**. In: Emerging diseases of animals, ASM: Press, Washington, DC, p. 161–184. 2000.

RHYAN, J. C. K.; AUNE, T. J.; ROFFE, D. R.; EWALT, S.; HENNAGER, T.; GIDLEWSKI, S.; OLSEN, S. C.; CLARKE, R. Pathogenesis and epidemiology of brucellosis in Yellowstone bison: Serologic and culture results from adult females and their progeny. **Journal Wildlife Diseases**, v. 45, p. 729–739, 2009.

SANGARI, F. J.; AGUERO, J.; GARCÍA-LOBO, J. M. The genes for erythritol catabolism are organized as na inducible operon in *Brucella abortus*. **Microbiology**, v. 146, p. 487-495, 2000.

SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLECHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRÜGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 9, p. 153-156, 2009.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSÉN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp.,

isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B. K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 801-808, 2010.

SANDFOSS, M. R.; DEPERNO, C. S.; BETSILL, C. W.; PALAMAR, M. B.; ERICKSON, G.; KENNEDYSTOSKOPF, S. A Serosurvey for *Brucella suis*, Classical Swine Fever Virus, *Porcine circovirus* Type 2, and *Pseudorabies virus* in Feral Swine (*Sus scrofa*) of Eastern North Carolina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, 462-466, 2012.

STOFFREGAN, W. C.; OLSEN, S. C.; WHEELER, C. J.; BRICKER, B. J.; PALMER, M. V.; JENSEN, A. E.; HALLING, S. M.; ALT, D. P. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. **Journal Veterinay Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 227-237, 2007.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, p.180, 1999.

TESSARO, S. V.; FORBES, L. B. Experimental *Brucella abortus* infection in wolves. **Journal Wildlife Disease**, v. 40, p. 60-65, 2004.

TOCANTINS, S.; CINTRA, R.; FRIEIRO-COSTA, F. A. Distribuição espacial da brucelose no gado bovino do Pantanal, Cáceres, MT. In: Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, 3. **Resumos**. Os Desafios do Novo Milênio. Corumbá, MS, 2000. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congresso/Bioticos/TOCANTINS-068.pdf>> Acesso em: 12 de abril de 2010.

UHART, M. M.; VILA, A. R.; BEADE, M. S.; BALCARCE, A.; KARESH, W. B. Health evaluation of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. **Jounal Wildlife Disease**, v. 39, p. 887-893, 2003.

VERGER, J. M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; GRAYON, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 35, p. 292-295. 1985.

WHATARAI, M.; ITO, N.; OMATA, Y.; ISHIGURO, N. A serological Survey of *Brucella* spp. In free-ranging Wild Boar (*Sus scrofa leucomystax*) in Shikoku, Japan. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 68, p. 1139-1141, 2006.

WYCOFF, A. C.; HENKE, S. E.; CAMPBELL, T. A.; HEWITT, D. G.; VERCAUTEREN, K. C. Feral swine contact with domestic swine: a serologic survey

and assessment of potential for disease transmission. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p. 422-429, 2009.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE): Chapter 2.8.5. **Porcine Brucellosis In Manual for Diagnosis Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**; 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.05_PORCINE_BRUC.pdf>. Acesso em: junho de 2013.

WU, N.; ABRIL, C.; HINIC V. BRODARD, I.; THUR, B.; FATTEBERT, J.; HUSSY, D.; RYSER-DEGIORGIS, M. Free-ranging wild boar: a disease threat to domestic pigs in switzerland? **Journal Wildlife Diseases**, v. 47, p. 868-879, 2011.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

EMPREGO DA PCR EM TEMPO REAL COMO FERRAMENTA DE DETECÇÃO DE *Brucella abortus* EM PORCOS-MONTEIROS (*Sus scrofa*) E COMPARAÇÃO COM SOROLOGIA E PCR CONVENCIONAL

Mônica S. Custódio¹, Cleber O. Soares² Grácia M. S. Rosinha^{2,3}.

¹Mestranda em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Felino Müller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil.

²Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia 830, Vila Popular, Campo Grande, MS 79106-550.

³Autor para correspondência (e-mail: rosinha@cnpqc.embrapa.br)

RESUMO: Relatos da ocorrência da brucelose tem se intensificado em populações silvestres que mantém relação simpátrica com bovinos. Animais como os porcos-monteiros (*Sus scrofa*) encontram-se em grande quantidade no Pantanal Sul-Mato-Grossense, utilizando o mesmo habitat que animais domésticos e silvestres. Devido a importância da brucelose e os crescentes relatos sobre a transmissão de *Brucella* spp. entre animais domésticos e silvestres, objetivou-se neste estudo avaliar a PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *Brucella abortus* em sangue de porcos monteiros (*S. scrofa*), comparando esta técnica com o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e com a PCR convencional. Foram coletadas amostras de sangue e soro de 30 porcos-monteiros no Pantanal Sul-Mato-Grossense. As amostras de soro foram submetidas ao teste do AAT. O DNA genômico das amostras de sangue foi extraído e posteriormente realizada a amplificação por meio da PCR, utilizando os pares de oligonucleotídeos IS711, BR0952 e Bruab2_0168, sendo este último também usado na qPCR. Os resultados observados no teste sorológico revelaram que 16,66% (5/30) dos soros foram considerados reagentes para o AAT. Utilizando o par de oligonucleotídeos gênero-específico IS711 foi possível observar em 66,66% (20/30) das amostras, um produto amplificado de aproximadamente 63 pares de base (pb). Não houve amplificação para as amostras testadas para *B. suis* com o oligonucleotídeo BR0952. Quando utilizado o par de oligonucleotídeos BruAb2_0168, 86,66% (26/30) das amostras amplificaram um fragmento de, aproximadamente, 81 pb, correspondente à espécie *B. abortus*. Os dados da qPCR demonstraram que 90% (27/30) dos animais foram considerados positivos para *B. abortus* quando utilizado o oligonucleotídeo BruAb2_0168. Com a utilização da qPCR foi possível identificar *B. abortus* no sangue de porcos-monteiros, assim como detectar animais sorologicamente negativos e os que não foram detectados utilizando a PCR convencional.

PALAVRAS-CHAVE: AAT, Brasil, *Brucella abortus*, porco-monteiro, qPCR.

ABSTRACT: Reports of the occurrence of brucellosis has intensified in wild populations that maintain sympatric respect with cattle. Animals such as feral swines (*Sus scrofa*) are aplenty in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, using the same habitat that wild and domestic animals. Due to the importance of brucellosis and the increasing reports of transmission of *Brucella* spp. among domestic and wild animals, the present study was held to evaluate the use of real-time PCR (qPCR) to identify this *B. abortus* in a population of feral swines (*S. scrofa*) comparing this technique with Buffered acidified antigen test (AAT) and the conventional PCR. Blood samples and serum were

collected of 30 feral swines in the Pantanal of Mato Grosso do Sul. The serum samples were subjected to serological testing of Buffered Acid Antigen (AAT). The genomic DNA of blood samples was extracted and later performed by PCR amplification using pairs of primers IS711, BR0952 and BruAb2_0168, the latter being also used in qPCR. The results observed in the serological test revealed that 16.66% (5/30) were considered reagents to the AAT. Using IS711 it was possible to observe 20 (66.66%) samples with 63 base pairs (pb) fragment, approximately. No amplification was detected in samples tested for *B. suis* with primer BR0952. Using the primer BruAb2_0168, 86.66% (26/30) samples showed fragment, approximately, of 81pb corresponding to the species *B. abortus*. The qPCR data showed that 90% (27/30) animals were considered positive for *B. abortus* when subjected to primer BruAb2_0168. With the use of qPCR was possible to identify *B. abortus* in the blood of feral swines, as well as detect seronegative animals and those that were not detected using conventional PCR.

KEY-WORDS: AAT, Brazil, *Brucella abortus*, feral swine, qPCR.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma importante zoonose com distribuição mundial, sendo seu agente etiológico bactérias intracelulares facultativas, Gram-negativas pertencentes ao gênero *Brucella*, que causam infecção em animais domésticos, silvestres e também nos seres humanos (Whatmore 2009; Olsen; Tatum, 2010).

A infecção por *Brucella* spp. vem sendo relatada mundialmente. Diversos países têm detectado espécies de *Brucella* em animais silvestres, o que pode tornar-se uma grave ameaça aumentando a possibilidade de disseminação e perpetuação do agente para outros animais. A criação de reservatórios na vida silvestre tem dificultado o controle dessa enfermidade, permitindo a retransmissão para animais domésticos e a persistência de *Brucella* spp. nessa população (Olsen; Stoffregen, 2005).

Uma das metas para o controle e erradicação da brucelose é o diagnóstico, baseado em testes sorológicos que são sensíveis e de fácil execução, sendo responsável pela detecção de anticorpos contra *Brucella* spp. Esses testes têm sido empregados para o diagnóstico da brucelose em animais silvestres, sem nenhum tipo de validação (Gall et al., 2001).

Desse modo, as técnicas de diagnóstico molecular representam um importante avanço na detecção deste patógeno. Ensaios utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos para detecção rápida de *Brucella* spp., (Gemechu et al., 2011) em diferentes amostras biológicas, como sêmen, tecido e sangue de diversos hospedeiros (Leal-Kleveza et al., 1995; Leal-Klevezas et al., 2000; Cvetinic et al., 2004; Myashiro et al., 2007; Elisei et al., 2010; Junqueira Junior et al., 2012). Em 2008, Hinic et al. utilizaram-se desta ferramenta para detectar e diferenciar as espécies do gênero *Brucella*. No ano seguinte, Hinic et al. utilizaram desta mesma técnica para identificar *Brucella* spp. a partir de sangue de javalis silvestres. O teste mostrou-se altamente capaz de identificar animais infectados em amostras negativas na sorologia e no isolamento bacteriano.

No Brasil, existe insuficiência de dados que demonstrem a detecção de *Brucella* spp. em animais silvestres, especialmente em regiões onde estes animais e domésticos vivem em simpatria, como no Pantanal (Girio et al., 2004). Este bioma é um importante refúgio, não apenas para a fauna silvestre, mas também para as espécies introduzidas, como os porcos-monteiros (*Sus scrofa*). Estudos realizados pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), por levantamentos aéreos, revelaram que existem,

aproximadamente, 9.800 grupos de porcos-monteiros que ocorrem em diferentes regiões do Pantanal brasileiro (Mourão et al., 2002)

Assim, objetivou-se, com este estudo, avaliar a qPCR para a detecção de *Brucella abortus* em sangue de porcos-monteiros (*Sus scrofa*), comparando esta técnica com o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e a PCR convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo e animais

Foram coletadas sangue de 30 porcos-monteiros (*S. scrofa*) de fazendas localizadas na região central do Pantanal Brasileiro, conhecida como sub-região Nhecolândia (18° 59' 15" sul, 56° 37' 03" oeste). Os sangues foram coletados em tubos com e sem ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e posteriormente armazenados a -20°C.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), com a autorização número 20029-1 para captura *in situ*, coleta e transporte de amostra biológica *in situ* e *ex situ*.

Diagnóstico sorológico

Os soros de porcos-monteiros foram examinados quanto à presença de anticorpos para *Brucella* spp. Para tanto foi realizado o teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), de acordo com as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2006).

Extração de DNA de sangue

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo *in house*, descrito por Araújo et al. (2009). A concentração e o grau de pureza dos DNAs extraídos foram avaliados em espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000). Em seguida todas as amostras de DNA foram concentradas a 100 ng/μL e a qualidade das mesmas foi observada em gel de agarose 0,8%, corado com *SYBR Safe* (Invitrogen®) e visualizadas em transiluminador ultravioleta.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A escolha dos genes foi baseada em dados da literatura. Para a identificação do gênero *Brucella*, utilizou-se o par de oligonucleotídeos gênero-específico IS711 (5'-GCTTGAAGCTTGCGCACAGT - 3' e 3'-GGCCTACCGCTGCGAAT - 5') e para a identificação da espécie *B. abortus*, utilizou-se o par de os oligonucleotídeos espécie-específico BruAb2_0168 (5'-GCACACTCACCTTCCACAACAA - 3' e 3'-CCCCGTTCTGCACCAGACT - 5'). Para a identificação da espécie *B. suis*, utilizou-se o par de os oligonucleotídeos espécie-específico BR0952 (5'-CCTGCAAAAAGCAGGAACCA - 3' e 3'-CCTCCGCCAGTCGTGAAA - 5'). Todos os oligonucleotídeos utilizados no presente estudo foram descritos por Hinic et al. (2008).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 μL, com cada reação contendo 200 ng de DNA, tampão PCR 10X, 0,03 mM MgCl₂, 5 pMol de cada oligonucleotídeo, 0,3 mM dNTP e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®).

As reações foram realizadas utilizando os DNAs extraídos de sangue e como controle positivo foi utilizada a amostra padrão S2308 de *B. abortus*. Os ciclos de temperaturas empregados foram de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os amplicons foram revelados após eletroforese em gel de agarose 3%, corado com *SYBR Safe* (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

PCR em tempo real (qPCR)

Os oligonucleotídeos BruAb2_0168 e a sonda (FAM 5'-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-3' BHQ-1) utilizados para a amplificação e detecção de *B. abortus*, foram descritos por Hinic et al. (2008). Para amplificação do fragmento alvo foram utilizados 12,5 uL TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Foster, City, CA, USA), 5 pMol de cada oligonucleotídeo BruAb2_0168, 5 pmol da sonda TaqMan® (Applied Biosystems) e 200 ng de amostra de DNA, em um volume final de 25 µl. Um controle interno positivo de DNA extraído da amostra virulenta S2308 de *B. abortus*. Como controle interno negativo da reação, utilizou-se água livre de nucleases e amostras de DNA de peixe e besouro.

As condições de amplificação do fragmento alvo por meio da PCR em Tempo Real, utilizando TaqMan® foram de 40 ciclos divididos em uma pré-PCR à 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguida de desnaturação à 95 °C por 15 segundos e anelamento à 60°C por 1 minuto.

Clonagem e sequenciamento

O produto da PCR com o oligonucleotídeo Bruab2_0168 foi clonado no vetor pGEM-T easy (Promega) e sequenciado usando Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) com o oligonucleotídeo universal T7. As sequências foram analisadas por meio do *software* BioEdit e, em seguida, foram submetidas ao programa BLASTn, para confirmar a identidade da sequência.

Análise estatística

As diferenças entre as frequências de resultados positivos foram avaliadas por meio do teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Das 30 amostras de soros sanguíneos de porcos-monteiros, 16,66% (5/30) apresentaram reação de soroprecipitação positiva para o teste do AAT.

Quando as amostras foram testadas pela técnica de PCR com o par de oligonucleotídeos gênero-específico IS711 foi possível identificar que 66,66% (20/30) das amostras apresentaram-se positivas para *Brucella* spp., com a amplificação de um fragmento de aproximadamente 63 pb (Figura 1).

Quando testadas com o par de oligonucleotídeos espécie-específico BruAb2_0168, 86,66% (26/30) amplificaram o fragmento de aproximadamente 81 pb (Figura 2).

As quatro amostras consideradas negativas para *B. abortus* foram testadas para *B. suis* utilizando o oligonucleotídeo Br0952. Não houve amplificação de um fragmento de 83 pb em nenhuma das amostras testadas.

Na qPCR utilizando o par de oligonucleotídeos BruAb2_0168, foi possível identificar que 90% (27/30) dos animais foram positivos.

Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes testes empregados, de acordo com cada grupo formado ($P < 0,05$).

As sequências consenso obtidas no sequenciamento apresentaram 100% de identidade com *B. abortus* (acesso número AE017224, e-value $2e^{-33}$)

DISCUSSÃO

Os métodos sorológicos são de grande valia para demonstrar a presença da brucelose em rebanho bovino, porém quando utilizados em outras espécies de hospedeiros, estes tem suas limitações (Mathias et al., 1999). A baixa frequência de porcos-monteiros positivos encontrados no teste sorológico deve-se ao fato de que a resposta de anticorpos é dependente da fase de infecção durante o momento da coleta das amostras (Carpente, 1975), levando a concluir que estes animais estavam em uma fase aguda da infecção, onde os anticorpos estavam abaixo do limite detectável (Hinich et al., 2009).

Estudos com infecções naturais e experimentais indicam que quase todas as espécies animais susceptíveis a infecção por *Brucella* spp. podem perder os títulos de anticorpos com o decorrer do tempo, levando ao aparecimento de resultados falso-negativos o que interfere nos dados da prevalência da brucelose (Godfroid, 2002). Deve-se evidenciar que os testes sorológicos utilizados são desenvolvidos e validados para os bovinos, podendo não apresentar as mesmas propriedades diagnósticas para os animais silvestres. Desse modo, a PCR é considerada mais vantajosa, pois detecta a presença de *Brucella* spp. independente da espécie hospedeira.

No ano de 2009, por meio da PCR, Hinich et al. verificaram a presença de *Brucella* spp. em javalis silvestres (*S. scrofa*), observando uma frequência de *Brucella* spp. em 13,6% (27/199) das amostras testadas. Entretanto, no presente estudo, utilizando-se número amostral menor e oligonucleotídeo gênero-específico, foi possível verificar uma frequência amostral de 66,66% (20/30); sugerindo que a brucelose pode ser um problema entre os porcos-monteiros na área estudada e que estes animais podem representar riscos para outros animais domésticos e silvestres.

Em contraste, a PCR convencional com BruAb2_0168 foi capaz de detectar DNA de *B. abortus* em 86,66% (26/30) das amostras de sangue testadas (Figura 2). Foi observado que o par de oligonucleotídeos IS711 apresentou uma menor sensibilidade quando comparado com par de oligonucleotídeos espécie-específico BruAb2_0168. Provavelmente, os resultados obtidos com IS711 devem-se por este oligonucleotídeo ser menos específico do que BruAb2_0168; uma vez que o IS711 é considerado gênero-específico.

No presente trabalho não foi encontrada a ocorrência de *B. suis* em porcos-monteiros. Possivelmente, esses animais podem estar infectados por outras espécies de *Brucella* spp., uma vez que com exceção de uma amostra, as demais foram positivas quando testadas no oligonucleotídeo IS711.

Os resultados encontrados nos testes moleculares são preocupantes, uma vez que a brucelose tem sido registrada em bovinos, cervídeos e em porcos-monteiros na região do Pantanal (Pellegrin et al., 2006; Paes et al., 2008; Chate et al., 2009; Elisei et al. 2010). Provavelmente, o elevado número de porcos-monteiros infectados nesse estudo,

deve-se a proximidade com os bovinos cuja criação é extensiva (Desbiez, 2009), permitindo assim, maior interação e transmissão de doenças entre os suínos silvestres e os animais domésticos (Corn et al., 2009). Como os suínos vivem em grupos, caso haja um macho infectado, este pode excretar *Brucella* spp. no sêmen e favorecer a disseminação do patógeno (Anon, 2007). Em uma região como o Pantanal, onde há superposição de habitats, a presença de porcos-monteiros portadores de *Brucella* spp. pode contribuir para a manutenção da bactéria nas espécies silvestres e domésticas (Monteiro et al. 2006; Pellegrin et al. 2006).

Uma dificuldade encontrada na PCR convencional decorre do fato de que para a visualização dos amplicons, é necessária a realização da eletroforese em gel de agarose. Esse procedimento não fornece uma boa resolução dos fragmentos de DNA, o que pode dificultar a interpretação dos resultados. Para solucionar este problema, a técnica da qPCR fornece dados quantitativos das amostras testadas, além de amplificar sequências específicas do DNA a cada ciclo, mediante o uso de marcadores fluorescentes, sendo altamente sensível e específica (Hinic et al. 2009).

As amostras testadas na qPCR mostraram-se sensíveis nas reações com o par de oligonucleotídeos espécie-específico BruAb2_0168, detectando 90% (27/30) de animais infectados com *B. abortus*. Entretanto, quando comparado os resultados da PCR convencional com qPCR, utilizando o mesmo oligonucleotídeo, não foi encontrada diferença estatística ($P = 1,000$). Em comparação com a análise por qPCR, os métodos convencionais para a detecção de *Brucella* spp. são tecnicamente mais demorados. O ensaio de qPCR utilizado neste estudo, possibilitou a identificação de *B. abortus* a partir de amostras de sangue de porcos-monteiros, demonstrando que a técnica pode ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da brucelose nesses animais. A técnica de qPCR permitiu a obtenção dos resultados de forma mais rápida do que a PCR convencional, além de diminuir substancialmente o risco de possíveis contaminações no momento de aplicação do produto da PCR quando submetido no gel de agarose.

Embora testes sorológicos detenham um papel importante no controle e erradicação da brucelose em animais domésticos, os resultados não são satisfatórios para a espécie silvestre testada. Por esse motivo, a combinação de técnicas moleculares como PCR e qPCR podem auxiliar pela praticidade e elevar o número de animais infectados, devido a sensibilidade e especificidade que cada técnica apresenta.

Portanto, no presente estudo, o uso de testes moleculares permitiu encontrar um maior número de animais infectados do que no teste sorológico, sendo a qPCR responsável por detectar um maior número de animais infectados. Empregando a técnica de PCR em tempo real, foi possível detectar a infecção de *B. abortus* em porcos-monteiros com maior rapidez quando comparada com a PCR convencional; uma vez que a qPCR permite o acompanhamento de cada reação e a obtenção dos resultados é dada de forma mais rápida e precisa do que a PCR convencional, que exhibe apenas os resultados qualitativos. Embora, não se tenha observado diferenças nos resultados obtidos entre as técnicas moleculares, a qPCR demonstra ser uma técnica promissora para o diagnóstico do agente causador da brucelose em porcos-monteiros, como demonstram os resultados obtidos no presente estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pelo financiamento do projeto e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

LITERATURA CITADA

- Al-Ajlan HH, Ibrahim AS, Al-Salamah AA. 2011. Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *Pol J Microbiol* 60: 27-33.
- Anon. 2007. *Porcine and rangeliferine brucellosis: Brucella suis*. Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, Ames, 1-6.
- Araújo FR, Ramos CAN, Luíz HL, Pérez IAHFS, Oliveira RHM, Souza IIF, Russi, LS. 2009. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. *Comunicado Técnico* 120, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 1-5.
- Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46(6):1897-1900. PMID:18400914 PMCID:2446855.
- Brasil. 2006. *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCBET*. Brasília, DF: MAPA, Secretária de Defesa Animal.
- Carpenter PL. 1975. *Immunology and Serology*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company.
- Chate SC, Dias RA, Amaku M, Ferreira F, Moraes GM, Costa Neto AA, Monteiro LARC, Lôbo JR, Figueiredo VCF, Gonçalves VSP, Ferreira Neto JS. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61: 46-55.
- Cvetnic Z, Tonic J, Spicic S, Lojkic M, Terzic S, Jemersic L, Humski A, Curic S, Mitak M, Habrun B, Brstilo M, Oceppek M, Krt B. 2004. Brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in the Republic of Croatia. *Vet Med – Cze* 4: 115–122.
- Corn JL, Cumbee JC, Barfoot R, Erickson GA. 2009. Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production. *J Wildl Dis* 45: 713-21.
- Desbiez ALJ, Bodmer RE, Tomas WM. 2009. Mammalian Densities in a Neotropical Wetland Subject to Extreme Climatic Events. *Biotropica*. 372-378.
- Elisei C, Pellegrin A, Tomas WM, Soares CO, Araújo FR, Funes-Huacca ME, Rosinha GMS, 2010. Evidência molecular de *Brucella* sp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesq Vet Bras* 30:503-509.
- Gall D, Nielsen K, Forbes L, Cook W, Leclair D, Balsevicius S, Kelly L, Smith P, Mallory M. 2001. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *J Wildl Dis* 37:1.

- Gemechu MY, Gill JP, Arora AK, Ghatak S, Singh DK. 2011. Polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid diagnosis and its role in prevention of human brucellosis in Punjab, India. *Int J Prev Med* 2:170-177.
- Girio RJS, Pereira FLG, Filho MM, Mathias LA, Herreira RCP, Alessi AC, Girio TMS. 2004. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente. *Ciencia Rural* 34: 165-169.
- Godfroid, J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Rev Scien Tech* 21: 277–286.
- Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetnic Z, Makaya PV, Frey J, Abril C. 2008. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J Microbiol Meth* 75: 375-378.
- Hinic V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R, Abril C. 2009. IS711- based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wildboars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Vet Research* 5:22.
- Ilhan Z, Aksakal A, Ekin IH, Gülhan T, Solmaz H, Erdenlig S. 2007. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Lett Appl Microbiol* 46:301-306.
- Junqueira Junior DG, Rosinha GMS, Carvalho CEG, Oliveira CE, Sanches CC, Lima Ribeiro AMC. 2012. Detection of *Brucella* spp. DNA in the semen of seronegative bulls by polymerase chain reaction. *Transboundary Emerging Diseases* doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01347.x.
- Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino, A, Martínez-Soriano JP. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 33: 3087-3090.
- Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, García-Cantú J, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. 2000. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Vet Microbiol* 75:91-7.
- Mathias LA, Girio RJS, Duarte JMB. 1999. Sero-survey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in Pampas Deer from Brazil. *J Wildl Dis* 35:112–114.
- Miyashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME. 2007. 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). *Braz J Microbiol* 38:17-22.

- Monteiro, LARC, Pellegrin AO, Ishikawa MM, Osório ALAR. 2006. Investigação epidemiológica de brucelose bovina em um estrato do estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras* 26: 217-222.
- Mourão GM, Coutinho ME, Mauro RA, Tomás WM, Magnusson W. 2002. *Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos*. Embrapa Pantanal: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28.
- Myashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME. 2007. 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). *Braz J Microbiol* 38: 17-22.
- O'Leary S, Sheahan M, Sweeney T. 2006. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res Vet Science* 81:170-176.
- Olsen S, Tatum F. 2010. Bovine brucellosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:18-27.
- Olsen S, Stoffregen WS. 2005. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev Vaccines* 4:915-928.
- Paes S, Ribeiro OC, Carneiro Monteiro LAR, Figueiredo AO, Neto AAC, Oliveira JM, Da Rosa GO, Keuroglan A, Piovezan U, Herrera HM. 2009. *Enfermidades de ocorrência no porco monteiro (Sus scrofa) no Pantanal sul-mato-grossense, Brasil*. Anais 35ª Conbravet, Gramado, RS. (Resumo).
- Pellegrin AO, Leite RMH, Sereno JRB, Lage AP, Leite RC, Ravaglia E. 2006. Brucelose bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares. *Comunicado Técnico* 58, Embrapa Pantanal, Corumbá.
- Whatmore AM. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol* 9:1168-1184.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2009. *Brucelose suína*. In: No Manual de Testes para Diagnóstico e Vacinas para Animais terrestres. http://www.webcitation.org/query.php?url=http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.05_PORCINE_BRUC.pdf&refdoi=10.1186/1746-6148-8-80. Acessado em junho de 2013.

TABELA DE CONTIGÊNCIA

Amostras	AAT	PCR IS711	PCR BruAb2_0168	qPCR BruAb2_0168
1	+	+	-	+
2	-	+	+	+
3	-	+	+	-
4	-	+	+	+
5	-	+	+	+
6	-	-	+	+
7	-	+	+	+
8	-	-	+	+
9	+	-	+	+
10	-	+	-	+
11	-	+	+	+
12	-	+	+	+
13	-	+	+	+
14	-	+	+	+
15	-	+	+	+
16	-	+	+	+
17	-	+	+	-
18	-	-	+	+
19	-	+	+	+
20		+	+	+
21	+	+	+	-
22	-	+	-	+
23	-	+	+	+
24	+	+	+	+
25	-	-	+	+
26	-	-	+	+
27	-	-	+	+
28	+	-	-	+
29	-	-	+	+
30	-	-	+	+

Tabela 1: Comparação dos resultados obtidos no teste sorológico (AAT), com a PCR convencional utilizando os oligonucleotídeos IS711 e BruAb2_0168 e qPCR com o oligonucleotídeo BruAb2_0168.

FIGURAS

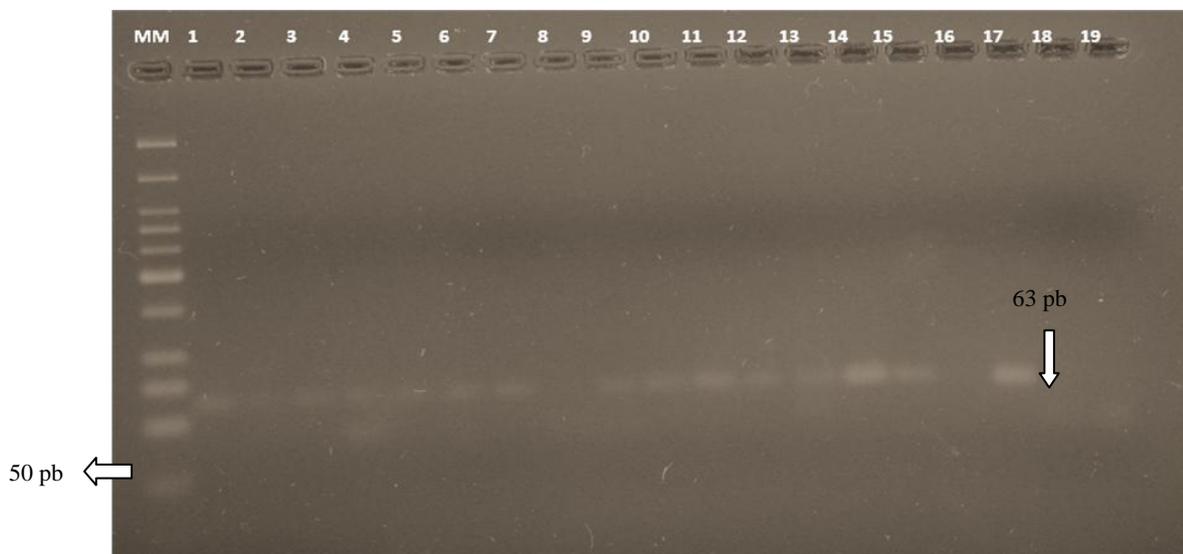


Figura 1. Análise do produto amplificado pela PCR utilizando-se o oligonucleotídeo IS711. Eletroforese em gel de agarose 3% corado com *Syber Safe*. 1: Marcador Molecular 25 pb LOW DNA Ladder New England (BioLabs). 2 a 17: amostras de sangue de porcos-monteiros com bandas características de *Brucella* spp. 17 e 18, controle positivo de *B. abortus* S2308 e controle negativo, sem adição de DNA, respectivamente.

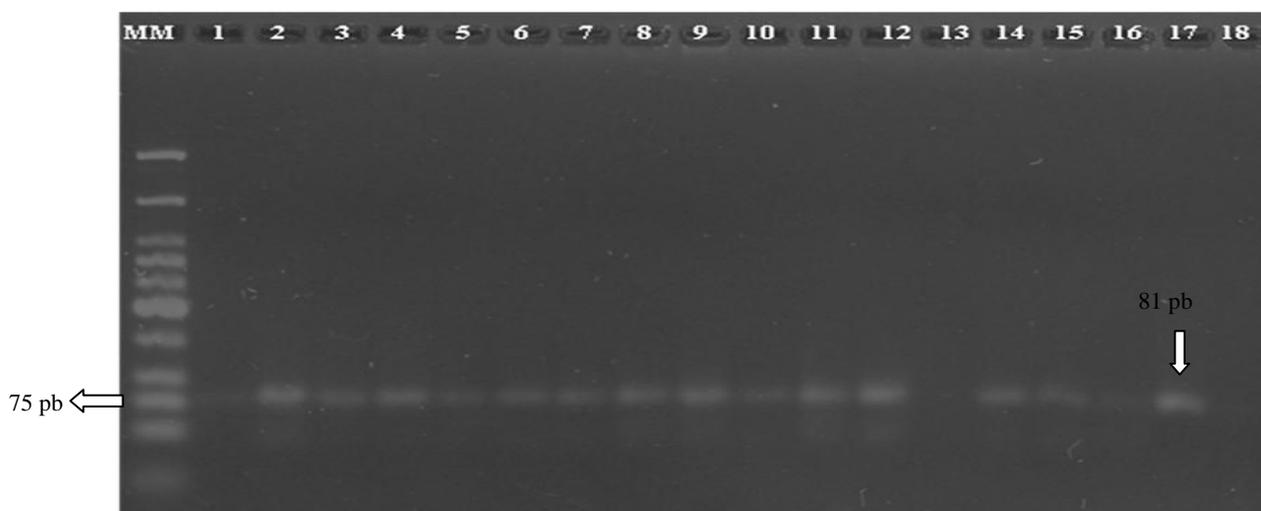


Figura 2. Análise do produto amplificado pela PCR utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador BruAb2_0168. Eletroforese em gel de agarose 3% corado com *Syber Safe*. 1: Marcador Molecular 25 pb LOW DNA Ladder New England (BioLabs). 2 a 16: amostras de sangue de porcos-monteiros com bandas características de *Brucella abortus*. 17 e 18, controle positivo de *B. abortus* S2308 e controle negativo, sem adição de DNA, respectivamente.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

DETECÇÃO DA AMOSTRA VACINAL S19 DE *Brucella abortus* EM PORCOS-MONTEIROS (*Sus Scrofa*).

Mônica S. Custódio¹, Cleber O. Soares² Grácia M. S. ^{2,3}.

¹Mestranda em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Felino Müller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil.

²Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia 830, Vila Popular, Campo Grande, MS 79106-550.

³ Autor para correspondência (gracia.rosinha@embrapa.br)

RESUMO: Brucelose é uma enfermidade causada por bactérias do gênero *Brucella*, um patógeno intracelular facultativo, que tem sido identificado em uma grande variedade de animais silvestres. A prevenção contra infecções causadas por *Brucella abortus* em bovinos é feita principalmente por meio de administração da amostra vacinal S19. Esta amostra sofreu uma mutação espontânea no gene *ery*, com deleção de 702 pares de base (pb), ocorrendo a inibição do crescimento desta na presença de eritritol. Dessa forma, tem se utilizado o gene relacionado ao catabolismo do eritritol (*ery*) para diferenciar a amostra vacinal S19 da amostra de campo. Objetivou-se neste estudo, identificar *B. abortus* amostra vacinal S19 a partir do sangue de porcos-monteiros (*Sus scrofa*), por meio da PCR. Nesse estudo, amostras de sangue de 30 porcos-monteiros foram coletados do Pantanal Sul-Mato-Grossense. O DNA genômico das amostras de sangue foi extraído e posteriormente realizada a amplificação por meio da PCR, utilizando os pares de oligonucleotídeos Ery 1 e 2. Identificou-se sete (23,33%) porcos-monteiros infectados com *B. abortus* amostra vacinal S19, sendo que três destes também foram positivos para amostra de campo. Os resultados do presente trabalho, demonstram a circulação de amostra vacinal S19 de *B. abortus* no ambiente pantaneiro e entre os porcos-monteiros. Com a utilização do método molecular, foi possível identificar as amostras de campo e S19, demonstrando que a brucelose pode ser um problema entre porcos-monteiros e que estes animais podem representar riscos para outros animais silvestres e domésticos.

PALAVRAS CHAVES: Brasil, *Brucella abortus*, brucelose, Pantanal, porcos-monteiros, S19.

ABSTRACT: Brucellosis is a disease caused by bacteria of the genus *Brucella* a facultative intracellular pathogen that has been identified in a wide variety of wild animals. The prevention of infections caused by *Brucella abortus* in cattle is mainly done through the administration of vaccine strain S19. This sample has undergone a spontaneous mutation in the *ery* gene, with a deletion of 702 base pairs (pb) were found to inhibit the growth of that in the presence of erythritol. Thus, it has been used the gene for catabolism of erythritol (*ery*) to differentiate the vaccine strain S19 sample field. The purpose this study was to identify *B. abortus* vaccine strain S19 from the blood of feral swines (*Sus scrofa*) by means of PCR. In this study, blood of 30 feral swines (*Sus scrofa*) were collected in the Pantanal of the State of Mato Grosso do Sul. The genomic DNA from blood samples was extracted later performed by PCR amplification using pairs of oligonucleotides Ery 1 and 2. Has identified seven (23.33%) feral swines infected with the vaccine strain *B. abortus* S19, and three of these were positive for the field sample. The results of this study demonstrate the movement vaccine strain S19 of *B. abortus* in the Pantanal environment and among feral swines. With the use of molecular method, it was possible to

identify the field samples and S19, demonstrating that brucellosis can be a problem among feral swines and that these animals can pose risks to other domestic and wild animals.

KEYWORDS: *Brucella abortus*, Brazil, brucellosis, feral swines, Pantanal, S19.

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Brucella* são os agentes etiológicos da brucelose, uma das principais doenças zoonóticas que pode infectar tanto animais silvestres, domésticos e seres humanos. O gênero contém diversas espécies que são definidas principalmente com base na especificidade do animal hospedeiro (Nicoletti, 1989; Boschioli et al., 2001). A brucelose bovina, causada por *B. abortus*, é uma doença infecciosa que causa grandes perdas econômicas à cadeia de bovinocultura de corte e leite, devido aos prejuízos causados em consequência dos distúrbios reprodutivos ocasionados nos animais (Poester et al., 2002; Monreal et al., 2003).

Um importante fator para a transmissão da brucelose entre animais domésticos e silvestres simpátricos é o compartilhamento da mesma pastagem e água ou por meio do contato com fetos abortados, placenta ou líquidos uterinos que contaminam o ambiente (Begins et al., 2002; Muma et al., 2007). Nesse caso, os animais silvestres podem se tornar uma nova fonte de infecção e re-infectar animais domésticos, como no caso dos suínos infectados após o contato com javalis silvestres, na Europa (Godfroid et al., 2005).

Várias doenças que afetam os animais domésticos possuem programas de controle e erradicação, porém estes não estão focados nos reservatórios silvestres. No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) adotou no ano de 2001 a vacina S19 para a imunização em massa de vacas entre três e oito meses de idade, contra a brucelose (Brasil, 2006). A vacinação com S19 promove uma resposta imunológica idêntica àquela provocada por uma amostra de campo, no entanto, quando bovinos são vacinados na idade correta, todos os animais possuem os títulos de anticorpos diminuídos até um ano de idade (Brasil, 2006). Diferente de outros países como os Estados Unidos, onde há um grande esforço para eliminar brucelose de bovinos e suínos por meio de testes sorológicos em rebanhos sorreativos, no Brasil, não há nenhum programa de controle ou norma que regulamente a vacinação e/ou monitoramento da infecção causada por *Brucella* spp. nos animais silvestres.

Por essa razão, é de grande importância o emprego de testes que visem à detecção direta do agente, bem como diferenciação de animais infectados pela amostra vacinal dos animais infectados pela amostra de campo (Paulin; Ferreira Neto, 2003). Dessa forma, tem sido descrito um importante marcador que permite a diferenciação de S19 das amostras de campo, baseando-se em um gene ligado ao catabolismo do eritritol (*ery*) (Ewalt; Bricker, 2000). Sangari et al. (2000), descreveram um método de PCR que possibilitou a diferenciação da amostra vacinal S19 da amostra de campo. A possibilidade de diferenciação se deve ao fato de que a S19 sofreu uma deleção natural de 702 pb no gene *ery*, ocorrendo a inibição do crescimento dessa amostra na presença do eritritol.

Para obter mais informações em relação à presença de *Brucella* spp. em espécies silvestres é necessário a realização de testes de diagnóstico para verificar a ocorrência desse patógeno nessa população (Scott; Smith 1994), pois muitas das infecções introduzidas na fauna silvestre se deve ao contato com animais domésticos infectados (Dobson; Meagher, 1996). Existe ainda a preocupação de que suínos infectados podem servir como reservatórios de doenças bacterianas, podendo representar uma ameaça a pecuária e à saúde humana (Musser et al., 2013).

Entretanto, mesmo com a relevância do tema, no Brasil, as informações de animais silvestres infectados com *Brucella* spp. ainda são escassas. Essa situação gera preocupação,

principalmente no ambiente pantaneiro, dado as suas características inerentes e por servir como abrigo a diversas espécies de animais, inclusive espécies exóticas, como o porco-monteiro (*Sus scrofa*).

Com isso, objetivou-se no estudo verificar a presença da amostra vacinal S19 de *B. abortus* em amostras de sangue de porcos-monteiros (*Sus scrofa*), utilizando a PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de estudo e animais

Foi coletado sangue de 30 porcos-monteiros (*S. scrofa*) de fazendas localizadas na região central do Pantanal Brasileiro, conhecida como sub-região Nhecolândia (18° 59' 15" sul, 56° 37' 03" oeste). Os sangues foram coletados em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e posteriormente, foram armazenados a -20 °C.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), com a autorização número 20029-1 para captura *in situ*, coleta e transporte de amostra biológica *in situ* e *ex situ*.

Extração de DNA de sangue

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo *in house*, descrito por Araújo et al. (2009). A concentração e o grau de pureza dos DNAs extraídos foram avaliados em espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000). Em seguida todas as amostras de DNA foram concentradas a 100 ng/μL e a qualidade das amostras foi observada em gel de agarose 0,8%, corado com *SYBR Safe* (Invitrogen®) e visualizadas em transiluminador ultravioleta.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos Ery 1 (5'-CCCAGAAGCGAGACGAAACG-3') e Ery 2 (5'-TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT-3'), relacionados com a deleção dos 702 pb referentes ao gene *ery* (Sangari et al., 2000).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 μl, com cada reação contendo 200 ng de DNA, tampão PCR 10X, 0,03 mM MgCl₂, 5 pMol de cada oligonucleotídeo, 0,3 mM dNTP e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®).

As reações foram realizadas utilizando os DNAs extraídos de sangue e como controle positivo foi utilizada a amostra padrão S2308 de *B. abortus*. Os ciclos de temperaturas empregados foi de desnaturação a 94 °C por 1 minutos, seguido por 34 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 68 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os amplicons foram revelados após eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *SYBR Safe* (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

RESULTADOS

Com o emprego dos oligonucleotídeos Ery 1 e Ery 2 foi possível identificar 23,33% (7/30) animais positivos para amostra vacinal S19, amplificando um fragmento de, aproximadamente, 361 pb. Destas sete amostras positivas para a amostra vacinal S19, três também foram positivas

para a amostra de campo, amplificando um fragmento de, aproximadamente, 1063 pb, correspondendo ao gene *ery* intacto (Figura 1).

DISCUSSÃO

A infecção causada por *Brucella* spp. em animais silvestres vem sendo relatada mundialmente e os resultados obtidos no presente trabalho, não foram diferentes. Empregando a técnica de PCR, foi possível constatar que 23,33% (7/30) dos porcos-monteiros estudados estavam infectados com a amostra vacinal S19 de *B. abortus*. Sendo este o primeiro relato de identificação da amostra vacinal S19 de *B. abortus* em porcos-monteiros na região do Pantanal Sul-Mato-Grossense.

A vacina S19 é considerada estável, uma vez que não se multiplica em presença do eritritol e causa mínimas reações locais e sistêmicas após sua inoculação em fêmeas de bovinos (Alton et al., 1988). Porém, algumas amostras de S19 são tolerantes ao eritritol e acredita-se que esta seja uma das causas para o desenvolvimento da infecção persistente com subsequente abortamento (Sangari et al., 1998). Dependendo da idade da fêmea e dosagem da vacina, pode ocorrer uma infecção persistente no útero, levando a eliminação da amostra vacinal (Myashiro et al., 2007) e se administradas em fêmeas no final de gestação, pode levar ao aborto como fazem as amostras de campo da bactéria (Brasil, 2003). Em alguns casos, em que os animais são vacinados na idade recomendada (três a oito meses), também pode ocorrer o abortamento ou uma infecção persistente ocasionado pela própria vacina, havendo sua eliminação por meio do leite ou excreções vaginais (Myashiro et al., 2007). Desse modo, a infecção da amostra vacinal S19 nos suínos silvestres pode ter ocorrido pelo contato com bovinos infectados com *B. abortus* ou com as secreções que foram lançadas no ambiente a partir de uma vaca vacinada, uma vez que bovinos e porcos-monteiros compartilham do mesmo ambiente.

A constatação da infecção com a amostra vacinal S19 apresenta grande relevância por relatar a presença desta amostra no ambiente, sugerindo que a brucelose pode ser um problema entre os porcos monteiros na área estudada e que estes animais podem representar riscos para outros animais domésticos e silvestres, uma vez que os porcos-monteiros coabitam com diversas espécies de cervídeos, de taiassuídeos, bovídeos entre outros animais (Nascimento et al. 2000).

Estudos anteriores já demonstraram a infecção com a amostra vacinal S19 de *B. abortus* em suínos silvestres, como o publicado por Corn et al. (1986) que identificaram a amostra S19 de *B. abortus* em um porco silvestre, no Sul do Texas. Como o porco silvestre ocupava o mesmo ambiente e possuía estreita proximidade com o gado, os autores sugeriram que o porco infectou-se após ingestão de tecidos de uma vaca vacinada. Também foi relatada a infecção de S19 em uma população de suínos silvestres que tinham sido imunizados com *B. abortus* RB51, na Carolina do Sul (EUA). Os autores sugeriram que a infecção ocorreu, possivelmente, pela eliminação de fetos abortados a partir do gado vacinado com *B. abortus* S19 mantido na mesma propriedade onde se encontravam os animais silvestres (Stoffregen et al., 2007).

Outro dado obtido nesse estudo foi a infecção com a amostra de campo em três porcos-monteiros. Uma possível explicação se deve a proximidade com rebanhos infectados, que compartilham pastos, aumentando o contato direto e indireto com a bactéria eliminada durante o aborto ou parto, o que facilita a transmissão da bactéria, a outros animais. Além disso, deve-se levar em consideração a capacidade de sobrevivência ambiental da bactéria (Crawford et al., 1990), que contribui para a infecção de diversos animais que ocupam o mesmo espaço. Os três animais que foram considerados positivos tanto para amostra de campo quanto para amostra vacinal S19, indicam uma transmissão da amostra vacinal a partir do rebanho bovino aos porcos-monteiros e a co-infecção nessa população de suínos silvestres com a amostra de campo.

Outra preocupação que os resultados levam a refletir são os impactos econômicos, ambientais e os relacionados à saúde pública, justamente pelo fato do porco-monteiro representar uma importante fonte de alimento para as comunidades locais do Pantanal. A carne, se mal preparada, pode ser uma fonte potencial de infecção de *B. abortus*, assim como a manipulação de carcaças contaminadas que também representam um risco para a comunidade (Debiez et al, 2011).

Portanto, os resultados do presente trabalho demonstram a circulação de *Brucella abortus* no ambiente pantaneiro e entre os porcos-monteiros. Com a utilização do método molecular, foi possível identificar as amostras de campo e a amostra vacinal S19, demonstrando que a brucelose pode ser um problema entre porcos-monteiros e que estes animais podem representar riscos de infecção para outros animais domésticos e silvestres.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pelo financiamento do projeto e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

LITERATURA CITADA

- Alton GG. 1988. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Aust Vet J* 54: 551-557.
- Araújo FR, Ramos CAN, Luíz HL, Pérez IAHFS, Oliveira RHM, Souza IIF, Russi, LS. 2009. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. *Comunicado Técnico* 120, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 1-5.
- Brasil. 2003. *Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose – PNCEBT*: versão preliminar. Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- Brasil. 2006. *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCBET*. Brasília, DF: MAPA, Secretária de Defesa Animal.
- Bengis RG, Kock RA, Fischer J. 2002. Infectious animal diseases: The wildlife/livestock interface. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 21: 53–65.
- Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4: 58-64.
- Corn JL, Swiderek PK, Blackburn BO, Erickson GA, Thiermann AB, Nettles VF. 1986. Survey of selected diseases in wild swine in Texas. *J Am Vet Med Assoc* 9: 1029-32.
- Crawford RP, Huber JD, Adams BC. 1990. Epidemiology and surveillance. In: Nelson KE, Ducan JR. (Eds). *Animal brucellosis*, CRC: Boca Raton, 131–151.
- Desbiez ALJ, Keuroghlian A, Piovezan U, Bodmer RE. 2011. Invasive species and bushmeat hunting contributing to wildlife conservation: the case of feral pigs in a Neotropical wetland. *Oryx* 45: 78-83.

- Dobson A, Meagher M. 1996. The population dynamics of brucellosis in the Yellowstone National Park. *Ecology*, 77: 1026-1036.
- Ewalt DR, Bricker BJ. 2000. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol* 38: 3085-3086.
- Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ. 2005 From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* 36: 313-26.
- Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, López-Goñi I, Blasco JM, Cloeckaert A, Moriyón I. 2003. Characterization of *Brucella abortus* O – Polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun* 71: 3261-3271.
- Mourão GM, Coutinho ME, Mauro RA, Tomás WM, Magnusson W. 2002. *Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos*. Embrapa Pantanal: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28.
- Muma JB, Munyeme M, Samui KL, Skejerve E, Oloya BC. 2007. Risk factors for brucellosis in indigenous cattle reared in livestock–wildlife interface areas of Zambia. *Prev Vet Med* 80: 306–317.
- Musser, JMB, Schwartz AL, Srinath I, Waldrup KA. 2013. Use of serology and bacterial culture to determine prevalence of *Brucella* spp. in feral swine (*Sus scrofa*) in proximity to a beef cattle herd positive for *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *J Wildl Dis* 49: 215-220.
- Myashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME. 2007. 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). *Braz J Microbiol* 38: 17-22.
- Nascimento AA, Bonuti MR, Mapeli EB, Tebaldi JH, Arantes IG, Zettermann CD. 2000. Infecções naturais em cervídeos (Mammalia: Cervidae) procedentes dos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo, por nematódeos *Trichostrongyloidea Cram, 1927*. *Braz J Vet Res Anim Sci* 37: 153-158.
- Nicoletti PL. 1989. Relationship between animal and human disease. In: Young EJ, Corbel MJ (Eds). *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Flórida, p. 41-5.
- Paulin LMS, Ferreira Neto JS. 2003. *O Combate da Brucelose bovina*. Situação Brasileira. FUNEP, Jaboticabal.
- Poester FP, Gonçalves VS, Lage AP. 2002. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol* 90: 55-62.

- Sangari FJ, Agüero J, García-Lobo JM. 2000. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiol* 146:487-495.
- Sangari, FJ, Grillo MJ, Bagues MPJ, Carrero-González M, Garcia-Lobo JM, Blasco JM, Agüero J. 1998. The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella abortus* B19 vaccine strain is unrelated with its attenuated virulence in mice. *Vaccine* 16:1640-1645.
- Scott ME, Smith G. 1994. *Parasitic and infectious diseases: epidemiology and ecology*, Academic Press, San Diego, California, p. 398.
- Stoffregen W, Olsen SC, Jack Wheller C, Bricker BJ, Palmer MV, Jensen AE, Halling SM, Alt D P. 2007. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. *J Vet Diagn Invest* 19:227–237.

FIGURA

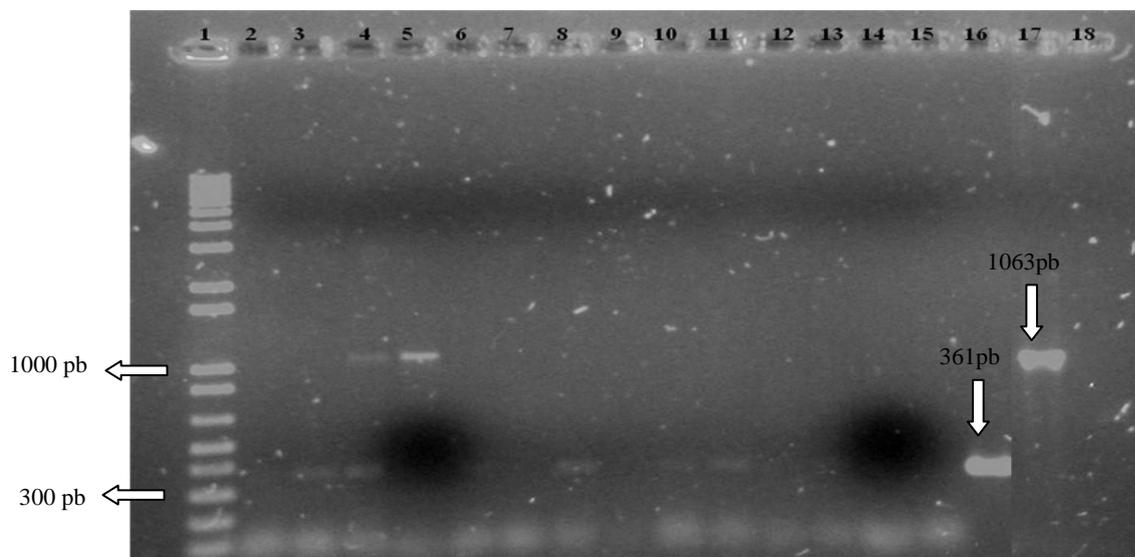


Figura 1. Análise do produto amplificado pela PCR utilizando o oligonucleotídeo iniciador Ery 1 e Ery 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBER Safe. 1: Marcador Molecular 1 Kb plus DNA Ladder. (Invitrogen); 4 e 5 amostras de porcos-monteiros com bandas característica de *B. abortus* virulenta; 3, 4, 8, 10 e 11 amostras de sangue de porcos-monteiros com bandas característica de *B. abortus* S19; 16 e 17, controle positivo de *B. abortus* S19 e *B. abortus* S2308, respectivamente. 18 controle negativo, sem adição de DNA