

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

**FREQUÊNCIA SOROLÓGICA, ISOLAMENTO E
DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella* spp. EM
PORCOS FERAIS (*Sus scrofa*) EM SIMPATRIA COM
BOVINOS NO PANTANAL DO MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL.**

Namor Pinheiro Zimmermann

CAMPO GRANDE, MS

2016

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

**FREQUÊNCIA SOROLÓGICA, ISOLAMENTO E
DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella* spp. EM
PORCOS FERAIS (*Sus scrofa*) EM SIMPATRIA COM
BOVINOS NO PANTANAL DO MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL.**

SEROLOGIC FREQUENCY, ISOLATION AND
MOLECULAR DETECTION OF *Brucella* spp. IN FERAL
PIGS (*Sus scrofa*) SYMPATRIC WITH CATTLE IN
PANTANAL OF MATO GROSSO DO SUL STATE, BRAZIL

Namor Pinheiro Zimmermann

Orientador: Prof^a Dr. Aiesca Oliveira Pellegrin

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito à obtenção do
título de Doutor em Ciência
Animal. Área concentração:
Saúde Animal

CAMPO GRANDE, MS 2016



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Doutorado

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezesseis, às oito horas, na Sala da Pós-graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Aiesca Oliveira Pellegrin (EMBRAPA/CPAP), Grácia Maria Soares Rosinha (Embrapa/CNPGC), Raquel Soares Juliano (Embrapa/CPAP), Rodrigo Silva Pinto Jorge (ICMBIO) e Rita de Cássia da Silva Paes (IAGRO), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **NAMOR PINHEIRO ZIMMERMANN**, CPF 00297495143, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Frequência sorológica, isolamento e detecção molecular de Brucella spp. em porcos ferais (Sus scrofa) em simpatria com bovinos no Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil**" e orientação de Aiesca Oliveira Pellegrin. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin		Aprovado
Dra. Grácia Maria Soares Rosinha		Aprovado
Dra. Raquel Soares Juliano		aprovado
Dr. Rodrigo Silva Pinto Jorge		Aprovado
Dra. Rita de Cássia da Silva Paes		Aprovado
Dra. Klaudia dos Santos Goncalves Jorge (Suplente)		

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas: Presidente da Banca Examinadora Aluno

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram do projeto diretamente ou indiretamente. Em especial agradeço a minha família pelo apoio em todos os momentos e a companheira de todas as horas Fabiana Pereira Machado e a sua família que sempre me apoiou nos momentos bons e difíceis.

Agradeço também a minha orientadora Aiesca Oliveira Pellegrin pelas oportunidades e pela confiança. Ao Igor Alexandre pelo companheirismo no campo e sempre um ajudando ao outro passamos por muitas aventuras e dificuldades no campo (Mano véio!!). Agradeço a Raquel Juliano pelas risadas e apoio em Corumbá sempre que precisei. Agradeço ao *Nego* durante as capturas no campo, ele sempre foi determinado em ajudar e animar o pessoal do campo, conhecido como o “*pegador de porco*”, uma pessoa muito prestativa sempre. Agradeço ao pessoal da fazenda Nhumirim e das fazendas que tiveram participação no projeto em especial as cozinheiras destas fazendas, sempre foram simpáticas e preparavam a comida do dia a dia. Lembro dos momentos bons com o pessoal da “*Ecologia*”, os biólogos que participaram em vários momentos do campo e lógico aos “estagiários” que trouxeram animação, né Thamy e Diego. Ao pessoal de Jaboticabal durante o trabalho na UNESP ao meu amigo Marcos Valério Garcia pelo companheirismo e muito guaraná!! Ao pessoal da USP pelo conhecimento transmitido. E ao LANAGRO e todos que ajudaram durante o período em Pedro Leopoldo (Valeu Lívia!!). Enfim foi um período de trabalho, conhecimento e de novas amizades!!!

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda.”

Albert Einstein

Resumo

ZIMMERMANN, N.P. Frequência sorológica, isolamento e detecção molecular de *Brucella* spp. em porcos ferais (*Sus scrofa*) em simpatria com bovinos no Pantanal do Mato Grosso Do Sul, Brasil. 2016. 60f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Os porcos ferais (*Sus scrofa*) são considerados reservatórios de vários agentes virais e bacterianos que causam doenças em animais de produção e humanos. Com a tendência do aumento da população destes suídeos de vida livre é necessário o diagnóstico e monitoramento sanitário destas populações. Atualmente, no Brasil ainda não há trabalhos relacionando a frequência de brucelose em porcos ferais e bovinos que vivem em simpatria, além da ausência de informações da epidemiologia e isolamento do agente e sua relação com os porcos ferais presentes no mesmo ambiente dos bovinos no Pantanal. Objetivou-se neste trabalho avaliar, por meio de três testes sorológicos (AAT, 2-ME e PFA), a frequência de anticorpos anti-*brucella* e a comparação desta nos porcos ferais e bovinos, bem como a obtenção do isolamento e detecção do DNA de *Brucella* spp. em diferentes amostras biológicas coletadas de porcos ferais no Pantanal de Mato Grosso do Sul. O estudo foi conduzido em nove propriedades rurais no município de Corumbá no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, compreendendo duas sub-regiões do Pantanal, Nhecolândia e Paiaguás. Foram capturados 105 porcos ferais e coletados materiais biológicos para a sorologia, isolamento e diagnóstico molecular de *Brucella* spp. e de 256 bovinos foram obtidos o soro sanguíneo para os testes sorológicos. A frequência de positivos para os porcos ferais na sorologia foi de 1% (1/105) no teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), nenhum porco feral positivo no teste confirmatório 2-Mercaptoetanol (ME) e 1% (1/105) no teste de polarização fluorescente (PFA). A frequência de positivos nos bovinos amostrados foi de 11,32%, 4,3% e de 7,42% nos testes AAT, 2-ME e no FPA respectivamente. A frequência nos rebanhos, com ao menos um animal positivo na propriedade, foi de 77,77% (7/9) e 100%, considerando os resultados do 2-ME e da FPA. O grau de concordância obtido entre os testes sorológicos 2-ME e a FPA utilizado nos bovinos foi de Kappa=0,506 ($p < 0.001$), 95% CI (0.282 – 0.729). Foi obtido o isolado

característico de *Brucella* spp. em oito porcos ferais sendo que, nestas culturas, foram detectados o DNA do gênero *Brucella* por meio da qPCR utilizando o primer *IS711*. Do produto adquirido na qPCR, proveniente da colônia obtida de um swab nasal, foi feita a Nested PCR na qual também se detectou o DNA. A amostra de DNA da colônia sequenciada obteve uma concordância de 100% com a sequência do gênero *Brucella* por meio da análise no BLAST. A detecção, nas amostras clínicas, do DNA de *Brucella* spp. foi obtida em 15 porcos ferais. De acordo com os resultados este é o primeiro isolamento e confirmação de *Brucella* spp. em porcos ferais de vida livre no Brasil. Há a presença de *Brucella* spp. nos porcos ferais na região do Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul e estes animais podem estar atuando como reservatórios de *Brucella* spp. Os testes sorológicos demonstraram que a brucelose está bem difundida nos bovinos, porém estes testes falharam em detectar os porcos ferais positivos na cultura.

Palavras-chave: Brucelose; diagnóstico; sorologia; reação em cadeia da polimerase; isolamento; suídeos exóticos.

Abstract

ZIMMERMANN, N.P. Serologic frequency, isolation and molecular detection of *Brucella* spp. in feral pigs (*Sus scrofa*) sympatric with cattle in Pantanal of Mato Grosso do Sul State, Brazil. 2016. 61f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

The feral pigs are considered reservoirs of several viral and bacterial agents causing diseases in humans and animals production. With the trend of increase in the population of wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and the presence of feral pigs in nine Brazilian states, the diagnosis and health monitoring of these populations is necessary. In Brazil, there is no related work with the frequency of brucellosis in sympatric populations of feral pigs and cattle, and the absence of epidemiological information and isolation of *Brucella* and its relation to the feral present pigs in the same environment of cattle in the Pantanal. We aim in this study evaluate by means of three serological tests (AAT, 2-ME and PFA) the presence of anti-*brucella* antibodies in feral pigs and cattle and obtaining the isolation and DNA detection of *Brucella* spp. in different biological samples collected from feral pigs living in sympatric with cattle in the Pantanal of Mato Grosso do Sul State. The study was conducted in nine farms in the municipality of Corumbá in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, comprising two sub-regions of the Pantanal, Nhecolândia and Paiaguás. 105 feral pigs were captured and collected biological samples for serology, isolation and molecular diagnosis of *Brucella* spp. and 256 cattle blood samples were collected for serological tests. The frequency of the positive serology was 1% (1/105) of the test buffered acidified antigen (TAA), no positive confirmatory test in feral pig on 2-Mercaptoethanol test (ME) and 1% (1/105) in the polarization test fluorescent assay (PFA). The positive frequency in the sampled cattle was 11.32%, 4.3% and 7.42% in the AAT, 2-ME and FPA tests respectively. The frequency in herds with at least one positive animal on the property, was 77.77% (7/9) and 100%, considering the results of 2-ME and FPA. The degree of agreement reached between the serological tests 2-ME and the FPA used in cattle was Kappa = 0.506 ($p < 0.001$), 95% CI (0282-0729). The characteristic isolated *Brucella* was obtained in eight animals. In all these cultures DNA was detected genus *Brucella*, by qPCR using the primer *IS711*. The acquired product in qPCR, from the colony obtained from a nasal swab, the Nested PCR was performed, which also detected the DNA. The DNA sample sequenced the colony obtained a 100% agreement with the sequence of *Brucella* genus by analyzing the BLAST. The detection of *Brucella* spp. DNA was obtained in 15 feral pigs. According to the results this is the first isolation and confirmation of *Brucella* spp. in feral pigs in Brazil. There is

the presence of *Brucella* spp. in feral pigs in the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State and these animals may be acting as reservoirs of *Brucella* spp. Serological tests have shown that brucellosis is widespread in cattle, but these tests have failed to detect positive feral pigs in the culture.

Keywords: Brucellosis; diagnosis; sorology; exotic swine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 PANTANAL.....	13
2.2 PORCO-MONTEIRO	14
2.3 BRUCELOSE	15
2.3.1 <i>Histórico</i>	15
2.3.2 <i>Classificação</i>	16
2.3.3 <i>Epidemiologia</i>	17
2.3.4 <i>Transmissão</i>	20
2.3.5 <i>Patogenia</i>	21
2.3.6 <i>Diagnóstico</i>	23
2.4 PORCOS FERAIS E A BRUCELOSE	29
REFERÊNCIAS.....	33
ARTIGO	48
FREQUÊNCIA SOROLÓGICA DE <i>BRUCELLA</i> SPP. EM PORCOS FERAIS E BOVINOS EM SIMPATRIA NO PANTANAL DO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.....	49
ISOLAMENTO E DETECÇÃO DO DNA DE <i>BRUCELLA</i> SPP. EM PORCOS FERAIS NO PANTANAL DO MATO GROSSO DO SUL	54

1 INTRODUÇÃO

Os porcos ferais (*Sus scrofa*) estão entre as espécies exóticas que mais causam danos, por sua grande capacidade de adaptação em ambientes diversos (LOWE et al., 2000). Sendo listados como uma das 100 maiores pragas do mundo (LOWE et al., 2000). No Brasil, o primeiro local de invasão foi o Pantanal, onde são localmente conhecidos por “porco-monteiro”. A presença dos suídeos ferais no Brasil é maior no centro sul do país e há a tendência de um aumento geográfico desta população (PEDROSA et al., 2015).

Em países com um controle sanitário da brucelose em estado mais avançado, também ocorre o monitoramento de populações selvagens de porcos ferais (AL DAHOUK et al., 2005; GRÉGOIRE et al., 2012; PEDERSEN et al., 2014). Segundo a OIE (2010), a brucelose está na lista das doenças que podem ser transmitidas de animais selvagens para humanos e animais domésticos.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) criado em 2001, não considera a inserção das populações de animais silvestres e exóticos como parte do monitoramento da brucelose e tuberculose. Já que a invasão e expansão destes suídeos pode trazer uma nova perspectiva no controle sanitário. Também há uma carência de estudos e de informações relacionadas à presença e a transmissão da brucelose, dentre outras doenças, entre a vida selvagem e os animais de produção no Brasil.

Com o conhecimento da epidemiologia de *Brucella* spp. nos porcos ferais e bovinos, pode-se tomar medidas que ajudariam a evitar a transmissão entre animais selvagens e domésticos, principalmente nas propriedades que aderiram à certificação de livres da brucelose ou mesmo nos estados livre sem vacinação, como no caso de Santa Catarina.

Com a tendência do aumento da população de porcos ferais no Brasil (PEDROSA et al., 2015) e a presença de porcos ferais em nove estados brasileiros (DEBERDT & SCHERER, 2007), é necessário o estabelecimento de

estratégias de diagnóstico baseado em testes validados para o monitoramento sanitário e/ou vigilância epidemiológica dessas populações. Neste contexto, ainda não se tem informações da epidemiologia, isolamento e a relação de *Brucella* spp. com os porcos ferais e outros suídeos selvagens no Brasil.

Objetivou-se neste trabalho obter a frequência sorológica de bovinos e porcos ferais, além do isolamento e a detecção do DNA de *Brucella* spp. em diferentes amostras biológicas coletadas dos porcos ferais que vivem em simpatria com bovinos, no Pantanal do Mato Grosso do Sul.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pantanal

O Pantanal é a maior área úmida contínua, tropical, de alagamento de áreas interiores do planeta. Localizada na bacia do Alto Paraguai com altitudes entre 80 e 120 metros. Possui uma suave inclinação de leste para oeste, da ordem de 0,3m a 0,5m/km-1, enquanto, no sentido de norte para sul, a inclinação varia de 0,03m a 0,15m/km -1 (DNOS, 1972). Segundo SILVA & ABDON (1998) o Pantanal tem aproximadamente uma área de 138.183 km², dividido em 11 sub-regiões: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paraguai, Paiaguás, Nhecolândia, Abobral, Aquidauana, Miranda, Nabileque e Porto-Murtinho.

O pantanal constitui uma extensa planície que se constitui em uma bacia sedimentar. O posicionamento geomorfológico e as características hidrológicas fazem com que o Pantanal exerça uma função de regulador do regime hídrico, ao atuar como uma “esponja”, provocando o retardamento e o escoamento da água. O sistema fluvial e a planície de inundação possibilitam a manutenção da complexidade paisagística e a sua biodiversidade. Sendo o rio Paraguai e seus afluentes o principal meio de transporte de água e sedimentos de forma contínua, esse transporte tem implicações na própria formação do Pantanal, (PACHECO DO AMARAL, 1986; SOUZA & CUNHA, 2004).

O clima é do tipo Aw, ou seja, quente e chuvoso no verão e ameno e seco no inverno. A precipitação anual se encontra na ordem de 1000 a 1400 mm, concentrada entre os meses de dezembro a março. O regime hidrológico depende das chuvas locais e das que ocorrem no planalto. As cheias nesta região apresentam claramente um ciclo sazonal distinto, que é caracterizado por um período de seca predominando de abril a setembro e, a partir de outubro, um período chuvoso relacionado a áreas inundadas, diferenciadas de acordo com a intensidade e a duração das precipitações (ADAMOLI, 1995). O regime de inundações é o fator ecológico fundamental do Pantanal que determina os pulsos dos principais processos bióticos e abióticos, bem como as composições específicas das unidades de paisagem (ADAMOLI, 1995).

Os ecossistemas que compõem a planície são caracterizados pela presença de florestas e cerradões sem alagamento periódico, campos inundáveis e ambientes aquáticos, como lagoas de água doce (baías) ou salobra (salinas), rios, e cursos de água intermitentes denominados vazantes e corixos (SOUZA et al., 2006). Também constituem o ambiente as cordilheiras que são pequenas elevações médias em torno de 2-3 m sobre o nível da água do campo de inundação (CUNHA, 1980). Em razão de sua posição mais elevada não sofrem inundação, a não ser no caso de enchentes excepcionais, servindo como áreas de refúgio, no período das cheias, para muitas espécies de animais silvestres e para o gado (SILVA et al., 1999).

2.2 Porco-Monteiro

O porco feral (*Sus scrofa*), conhecido localmente como porco-monteiro, chegou ao Pantanal trazido por colonizadores europeus há mais de dois séculos, sendo uma das espécies exóticas mais abundantes da região. Escapou dos rebanhos domésticos e se tornou selvagem, sendo associado a uma maior liberação de porcos no ambiente devido à guerra do Paraguai (1864-1870). Há uma estimativa de abundância de cerca de 9.800 mil (erro padrão de 1.400) grupos de porcos-monteiros no Pantanal (MOURÃO et al., 2002). Estes animais formam grupos e escavam grandes áreas de vegetação nativa, particularmente perto de depressões com água temporariamente ou permanentemente, conhecidas como “baías” e possuem hábitos diurnos ou noturnos (ALHO et al., 1987).

O porco-monteiro rapidamente adaptou-se as condições do Pantanal, com características morfofisiológicas e comportamentais que lembram mais o ancestral original do que um porco doméstico. Eles são onívoros e predam ocasionalmente animais jovens, ovos de aves que nidificam no chão (DESBIEZ et al., 2009), ovos de répteis como *Caiman crocodilos yacare* (CAMPOS, 1993) e vários tipos de espécies de invertebrados que vivem no solo (ALHO et al., 2011), além de se beneficiarem de fontes naturais e artificiais de água (MURI et al., 2005).

Os porcos-monteiros são caçados pela população local na forma de subsistência para a obtenção de carne e gordura (DEZBIEZ, 2007). A caça dos porcos-monteiros é de grande importância para a cultura pantaneira e contribuem para o estado de conservação da vida silvestre na região, pois há uma preferência pela caça de porcos-monteiros, agindo assim como substituidora dos animais autóctones (DEZBIEZ, 2007).

2.3 Brucelose

2.3.1 Histórico

Desde 460 a.C., era conhecido um tipo de febre, com sintomas compatíveis com a brucelose. Em 1887, o médico militar escocês David Bruce, juntamente com Guiseppe Carrauna Secluna isolaram do baço de quatro pessoas acometidas pela febre o agente *Micrococcus melitensis*, agente responsável pela febre de Malta (GODFROID et al., 2005; WYATT, 2013).

Em 1895, o patologista veterinário dinamarquês Bernhard Bang e Stribolt demonstraram o aborto epizoótico dos bovinos, isolando uma bactéria de fetos abortados de bovinos, denominada de *Brucella abortus*. Batizando a doença manifestada por doença de Bang (NICOLETTI, 2002).

Em 1897, Wright e Smith detectaram anticorpos do *Micrococcus melitensis* em humanos e em animais, através de testes de aglutinação, sugerindo um potencial zoonótico de transmissão. Em 1905, Zammit e Carrauna Secluna procederam ao isolamento de *Brucella sp.* no sangue de cabras, estabelecendo assim, o princípio zoonótico, que valorizava o papel dos animais na transmissão da infecção ao ser humano (WYATT, 2013).

O gênero *Brucella* foi definido por Meyer e Shaw em 1920, composto por *Brucella melitensis* e *Brucella abortus* como a segunda espécie. No decorrer de investigações, foram reconhecidas as espécies restantes do gênero *Brucella*. *Brucella suis* foi isolada em porcos em 1929 (HUDDLESON, 1929). Em 1956, Buddle identificou *Brucella ovis*, no estudo da causa de epididimite em carneiros (BUDDLE, 1956). Em 1957, STOENNER & LACKMAN (1957) isolaram *Brucella*

neotomae de uma espécie de rato em Utah, nos EUA. Em 1968, CARMICHEAL & BRUNER (1968) descobriram *Brucella canis* como causa de uma epidemia de abortos em cães da raça “beagles”.

Em 1994 EWALT & ROSS isolaram em animais marinhos *Brucella pinnipediae* e *Brucella ceti*. E mais recentemente foi descrito *Brucella microti* em 2008 (HUBALEK et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008) e em seguida a descrição de *Brucella inopinata*, isolada de uma infecção em um implante no seio de uma paciente de 71 anos de idade em 2010 (SCHOLZ et al., 2010).

TILLER et al. (2010) isolaram e caracterizaram uma nova cepa de *Brucella* spp. em roedores selvagens em Queensland, Austrália. Outro isolado, em sapos foi relatado por ser potencialmente uma nova espécie do gênero *Brucella* (EISENBERG et al., 2012).

WHATMORE et al. (2014) isolaram duas colônias de *Brucella papii* em crias natimortas e retenção de placenta em babuínos (*Papio* sp.) originados da África e levados para o Texas, EUA.

2.3.2 Classificação

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são cocobacilos ou bastonetes curtos Gram-negativos com 0,5 a 0,7 µm de diâmetro e 0,6 a 1,5 µm de comprimento, aeróbicas, imóveis, não formadora de esporos, pleomórficas, parasita intracelular facultativo, caracterizado pela infecção do sistema mononuclear fagocitário, acometendo humanos e outras espécies de mamíferos (ALTON et al., 1988).

O gênero *Brucella* pertence a subdivisão alpha-2 das Proteobactérias, juntamente com *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* e *Rickettsia* (YANAGI; YAMASATO, 1993).

Treze espécies são reconhecidas pertencentes ao gênero *Brucella*:

- Um grupo composto pelas espécies clássicas, incluindo diferentes biovars: *B. abortus* (biovars 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9), *Brucella melitensis* (biovars

1, 2 e 3), *B. suis* (biovars 1, 2, 3, 4 e 5), *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* (ALTON et al., 1988)

- Um grupo é representado por espécies mais recentes: *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* e *B. papii* (BANAI & CORBEL, 2010; WHATMORE et al., 2014).

- E duas outras espécies ainda sem nomenclatura definida (TILLER et al. 2010; EISENBERG et al., 2012).

Dentro do gênero *Brucella*, cada espécie apresenta o seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (cães), *B. neotomae* (ratos do deserto) (BRASIL, 2006), *B. suis* biovars 1 e 3 (suínos), *B. suis* biovar 2 (suíno, lebre), *B. suis* biovar 4 (rena), *B. suis* biovar 5 (roedores silvestres), *B. ceti* (cetáceos), *B. pinnipedialis* (pinípedes), *B. microti* (*Microtus arvalis*) (CLOECKAERT et al., 2001).

As espécies mais patogênicas para os animais de produção são: *B. abortus* (todos os biovars), *B. melitensis* (todos os biovars), *B. suis* (biovars 1, 2 e 3) e *B. ovis*. Apesar das respectivas preferências de hospedeiros, as espécies do gênero *Brucella* têm sido isoladas em uma grande variedade de espécies de animais selvagens (GODFROID 2013).

O gênero *Brucella* é dividido de acordo com a morfologia da colônia, em lisa (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*) e rugosa (*B. ovis* e *B. canis*); o fenótipo liso é devido à presença de lipopolissacarídeos compostos pelo lipídeo A e a cadeia de polissacarídeos O, enquanto o tipo rugoso não possui a cadeia O (CARDOSO et al., 2006). Devido a isso, praticamente todos os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*brucella* lisa utilizam antígeno de *B. abortus* (POESTER et al., 2010).

2.3.3 Epidemiologia

A brucelose é uma das zoonoses de maior importância mundial, particularmente nos países em desenvolvimento e em regiões particulares do

Mediterrâneo, ocidente da Ásia e partes da África e da América Latina (CORBEL 1997; TRUJILLO et al., 1994). Alguns países da região central e norte da Europa, Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia estão livres do agente (OIE, 2009). É classificada como Grupo de Risco III pela Organização Mundial da Saúde (OIE, 2009).

No Brasil a brucelose bovina é endêmica, segundo estudos sorológicos realizados no ano de 2009, foi encontrada em todas as regiões do país (POESTER et al., 2009). A prevalência da brucelose no Brasil no período de 1989-1998 se manteve entre 4% e 5% (POESTER et al., 2002). Inquéritos soroepidemiológicos no período de 2001 a 2004 demonstraram que a doença está disseminada em todo o país, existindo diferença de prevalência entre regiões e estados (LAGE 2008; PAULIN & FERREIRA NETO 2002).

Os biovars encontrados no Brasil são *B. abortus* biovars 1, 2, 3, 4 e 6, *B. suis* biovar 1, *B. ovis* e *B. canis*, sendo que as espécies *B. melitensis* e *B. neotomae* nunca foram isoladas no Brasil (POESTER et al., 2002; LUCERO et al., 2008).

No estado do Mato Grosso do Sul a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3% semelhante à de 1975 no estado do Mato Grosso (POESTER et al., 2002). MONTEIRO et al. (2006) executaram um estudo sorológico na região do planalto utilizando o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) em 2376 amostras de soro bovino, encontrando uma prevalência real individual estimada em 5,6% dos animais e a prevalência de rebanhos de 37,3%, enquanto que PELLEGRIN et al. (2006) testaram na região do Pantanal 309 animais em 16 rebanhos utilizando as referidas técnicas, estimando a prevalência em 1,36% sendo que sete das propriedades tinham pelo menos um animal positivo. CHATE et al. (2009) buscando caracterizar a situação epidemiológica da brucelose bovina no estado do Mato Grosso do Sul amostraram 14.849 animais, totalizando 1.004 propriedades, o teste utilizado foi o AAT, encontrando uma prevalência de 12,6% no Pantanal e 4,5% na região do planalto. LEAL FILHO et al. (2013) descreveram a prevalência no estado para os bovinos de 7%, sendo que a região do Pantanal apresentou 8,9%. Já a

prevalência de rebanhos no estado foi de 30,6% e na região do Pantanal de 39,1%.

As bactérias do gênero *Brucella* podem infectar diversas espécies selvagens. Espécies do gênero *Brucella* têm sido isoladas de uma grande variedade de espécies selvagens como bisões (*Bison bison*), porcos ferais (*Sus scrofa*), raposa (*Vulpes vulpes*), lebres (*Lepus europaeus*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), renas (*Rangifer tarandus*), uapiti (*Cervus canadensis*) (GODFROID, 2002).

Apesar da maioria das espécies de *Brucella* possuírem um hospedeiro primário, a infecção pode alcançar outros hospedeiros alternativos (TESSARO, 1986). No Brasil MAYOR et al. (2006) encontraram anticorpos anti-*brucella* em catetos (*Tayassu tajacu*) na região amazônica (4/41 animais). Na região do pantanal de Mato Grosso do Sul ELISEI et al. (2010) detectaram o DNA de *Brucella* spp. no sangue de 20,4% de um total de 44 veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*), por meio da PCR utilizando o *primer VirB5*. MATHIAS et al. (1999) não encontraram nenhum veado-campeiro (n=17) com anticorpos anti-*brucella* na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul.

BEJA-PEREIRA et al. (2009) realizaram a genotipagem de 10 números variáveis de repetições em tandem (VNTR) no locus do DNA de 56 isolados de *B. abortus* em bisão (*Bos bison*), veado-vermelho (*Cervus elaphus*) e bovinos para pesquisar os surtos de brucelose em bovinos na região da grande área do Yellowstone, encontrando uma similaridade entre a espécie de *Brucella* sp. que ocorre nos bovinos e nos veados vermelhos, sugerindo que o veado-vermelho é a espécie reservatória de origem dos surtos da doença.

No estado da Carolina do Sul nos Estados Unidos CORN et al. (2009) descreveram prevalência de 14% em suínos ferais (7/50) positivos no teste do AAT e na prova do rivanol. Na Europa lebres e javalis têm sido os principais reservatórios de *B. suis* biovar 2. Apesar de alguns países europeus possuírem o status de zona livre da brucelose, estes possuem o reservatório de *Brucella* spp. nos animais selvagens, podendo ameaçar os programas de erradicação.

Por isso os animais de vida livre devem ser cuidadosamente monitorados prevenindo a re-emergência da brucelose (GODFROID, 2002).

As espécies de *Brucella* sobrevivem no ambiente de acordo com os fatores ambientais; são susceptíveis ao processo de pasteurização, sobrevivem no solo úmido por até 10 semanas e tende a diminuir a sobrevivência em locais com temperaturas mais altas e na incidência de luz solar direta. A permanência no ambiente aumenta na presença de matéria orgânica e sobrevive por mais de 75 dias em fetos abortado e 200 dias em exsudatos uterinos (OMS, 1986). Podendo ser eliminada utilizando produtos clorados, solução de formaldeído a 2% em temperatura ambiente superior a 15°C e álcool a 70% destrói as bactérias imediatamente (OMS 1986; PAULIN & FERREIRA NETO 2002).

2.3.4 Transmissão

A transmissão de *Brucella* spp. ocorre principalmente pelo contato direto ou por meio dos aerossóis de fluídos ou tecidos contaminados com o nascimento ou o aborto de fetos infectados (ENRIGHT, 1990). Fêmeas infectadas continuam eliminando a bactéria nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias. As bactérias eliminadas no ambiente aliada a resistência ambiental de *Brucella* spp., é a principal fonte de infecção para os animais susceptíveis (CRAWFORD et al., 1990). A inseminação artificial utilizando sêmen contaminado também pode infectar as fêmeas susceptíveis (CRAWFORD et al., 1990).

A transmissão vertical para as crias pode ocorrer por meio da alimentação com leite infectado (ROOP et al., 2003). Filhos de vacas brucélicas podem se infectar durante a gestação, com *Brucella* sp. persistindo em seus pulmões e linfonodos regionais (OMS,1986). O pasto pode ser contaminado por fezes de bezerros que se alimentam com o leite infectado (ACHA; SZYFRES, 2001). Com isso, fêmeas infectadas com menos de sete meses de idade podem apresentar anticorpos anti-*brucella* não vacinais.

O controle e a erradicação da brucelose têm importantes implicações na saúde pública, já que a prevenção da brucelose humana depende predominantemente do controle da doença nos animais. A ocorrência da

brucelose nos humanos é geralmente ocupacional ou devido ao contato ambiental com os animais infectados (CORBEL, 2006) ou a ingestão de alimentos de origem animal como o queijo e o leite não pasteurizado (POESTER, 2002). Em humanos a brucelose pode ser causada por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* biovars 1, 2, 3, 4 e 5 e raramente *B. canis* e espécies de mamíferos marinhos (GODFROID, 2002).

2.3.5 Patogenia

A via de invasão mais comum da infecção por *Brucella* spp. é o trato gastrointestinal, devido a ingestão de alimentos e água contaminada. A infecção também é possível pela pele, conjuntiva ocular ou mucosa do trato respiratório através da inalação (CRAWFORD et al., 1990).

Após a infecção, o agente é fagocitado, principalmente pelos macrófagos e carreadas até os linfonodos regionais, onde se multiplicam intracelularmente nos fagócitos, podendo permanecer por semanas a meses (ANDERSON et al., 1986; BISHOP et al., 1994). A invasão dos vasos linfáticos é seguida pela bacteremia, difundindo-se para os tecidos do hospedeiro, colonizando principalmente órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como o baço, fígado e linfonodos (BISHOP et al., 1994; KO & SPLITTER, 2003).

Com relação às células do sistema mononuclear fagocitário, as bactérias do gênero *Brucella* utilizam vários mecanismos para evitar ou suprimir as respostas bactericidas (CORBEL, 1997). Estes processos são desencadeados pela internalização da bactéria que redireciona o tráfego intracelular, alterando o processo normal de maturação do fagossomo e bloqueando a fusão deste, contendo o patógeno, com o lisossomo (GORVEL et al., 2002). Em seguida ocorre o tráfego de um compartimento do fagossomo para o retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira, onde a bactéria tem um ambiente otimizado para a replicação (ANDERSON et al., 1986; PIZARRO-CERDÁ et al., 2000).

As cepas de morfologia colonial lisa de *Brucella* spp. geralmente invadem as células hospedeiras mais eficientemente que as cepas rugosas, sugerindo

que a cadeia O de lipopolissacarídeos (LPSO) possui um papel importante na sua virulência (KO; SPLITTER, 2003). A LPSO protege contra a morte bacteriana dentro do fagolisossomo e inibe a apoptose celular evitando a ativação da resposta imune (PORTE et al., 2003; JIMÉNEZ DE BAGÜÉS et al., 2004; PEI et al., 2006), agindo como um imunomodulador da proteína apresentadora de antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) da classe II (FORESTIER et al., 2000).

As espécies de *Brucella* contam com o sistema de secreção tipo IV (SST4), codificado pelo *virB* operon que é composto por 12 genes. O SST4 de *Brucella* spp. é envolvido no recrutamento de pontes de lipídios para a entrada de *Brucella* spp. nos macrófagos (WATARAI et al., 2002) e é requerida para que a bactéria possa atingir o nicho adequado e consiga replicar na célula hospedeira (COMERCI et al., 2001; SIEIRA et al., 2000).

Os locais com maior disponibilidade de eritritol são o útero gravídico, tecidos mamário, ósteoarticulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (CARTER, 1991). *B. abortus* tem um forte tropismo pelo útero durante o último trimestre da gestação, devida à alta concentração de eritritol e hormônios esteroideais. Embora, *Brucella abortus* S19 seja atenuada impossibilitando a sua multiplicação em presença de eritritol (PAULIN, 2003). O eritritol favorece a sobrevivência bacteriana, uma vez que possa ser metabolizado como uma fonte de carbono e energia (SAMARTINO; ENRIGHT, 1996).

As células trofoblásticas do placentoma localizadas na base das vilosidades coriônicas dos ruminantes são consideradas o local primário da invasão dos tecidos placentários fetais, de onde a bactéria se difunde para os trofoblastos inter cotiledonares. A multiplicação de *Brucella* spp. pode induzir a infiltração de células inflamatórias, necrose dos trofoblastos, vasculite e ulceração do tecido córion alantoideano. As trocas fetais-maternais ficam comprometidas resultando em aborto (ANDERSON et al., 1986; SANTOS et al., 1996).

Touros infectados podem desenvolver sinais sistêmicos da infecção, incluindo febre, anorexia e depressão, apesar da infecção ser frequentemente

inaparente (CAMPERO et al., 1990). A lesão mais significativa induzida por *B. abortus* em touros é a orquite (TRICHARD et al., 1982). As reações inflamatórias são do tipo necrosante nas vesículas seminais, testículos e epidídimos, podendo provocar subfertilidade, infertilidade ou esterilidade e consequente atrofia do órgão afetado (OMS, 1986).

No aparelho locomotor usualmente desenvolve uma sinovite fibrinosa à granulomatosa com a formação de projeções vilosas proliferativas e artrite com erosão articular que pode estar associada com uma bursite supurativa granulomatosa (JOHNSON et al., 1994). A infecção da glândula mamária pode ocorrer pela transmigração de leucócitos infectados com *Brucella* spp. para os alvéolos mamários, fornecendo um local de replicação nos alvéolos e ductos, com subsequente migração bacteriana da glândula mamária para os vasos linfáticos e destes para os linfonodos supramamários regionais (ADAMS 2002).

2.3.6 Diagnóstico

Os métodos de diagnósticos disponíveis para *Brucella* spp. podem ser utilizados para diferentes objetivos, como: diagnóstico confirmatório, estudos de prevalência, certificação de propriedades, e em países onde a brucelose já foi erradicada, deve-se manter a vigilância, a fim de evitar a reintrodução da doença por meio da importação de animais infectados ou produtos de origem animal (GODFROID et al., 2010).

O diagnóstico clínico é baseado nos sinais clínicos, como: aborto, nascimento de bezerros fracos e esterilidade de fêmeas e machos. O diagnóstico epidemiológico é feito de acordo com o histórico do rebanho de uma propriedade e o uso complementar dos testes diagnósticos diretos ou indiretos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

2.3.6.1 Diagnóstico direto

Os métodos de diagnóstico direto incluem o isolamento e identificação do agente, a imunohistoquímica e a detecção dos ácidos nucleicos (LAGE et al., 2006). Os métodos diretos são usados após a manifestação dos sintomas clínicos, quando a bactéria já esta disseminada no rebanho. Portanto, não são recomendadas para individualizar as fontes de infecção, mas para confirmar focos da doença e caracterizar o agente circulante (BATHKE, 1998).

É executado através do isolamento ou a detecção do ácido nucleico do agente a partir de fetos abortados (estômago, baço e pulmão), placenta, secreções vaginais, gânglios, leite, colostro, sêmen e coleta de fluido decorrente de artrites (GODFROID et al., 2010; POESTER 1997). Para a confirmação post-mortem, os tecidos de preferência são os linfonodos genital e da orofaringe, o baço, glândulas mamárias e principalmente os linfonodos supramamários (GODFROID et al., 2010).

O “padrão ouro” para o diagnóstico da brucelose é o isolamento e identificação, fornecendo, assim, o diagnóstico definitivo da doença. Porém o isolamento e identificação do agente são laboriosos, possui perigo biológico devido ao manuseio de bactérias vivas, além da demora no processo de isolamento e o resultado que nem sempre é definitivo (BRICKER 2002; YU & NIELSEN 2010). A vantagem desta técnica é a especificidade (OCAMPO-SOSA et al., 2005). As identificações das espécies do gênero *Brucella* podem ser feitas por meio da análise das características fenotípicas, provas bioquímicas que identificam diferenças metabólicas entre as espécies e biótipos (ALTON et al., 1988; CLOECKAERT et al., 2004).

Devido aos problemas inerentes ao isolamento e identificação, a PCR fornece um caminho adicional de detecção e identificação de *Brucella* spp. (OIE, 2009). A PCR possui alta sensibilidade, é muito específica e facilmente adaptável à alta demanda além do processo ser rápido e simples permitindo detectar a bactéria morta (BRICKER; HALLING 1994). As principais desvantagens devido à utilização da PCR como ferramenta de diagnóstico é a contaminação do material de laboratório, presença de fatores inibidores de enzimas e ácido nucleico e o alto custo dos equipamentos e reagentes (GODFROID et al., 2010).

BAILY et al. (1992) realizaram a PCR baseada no gene *BCSP31* utilizando

um único par de *primers* oligonucleotídeos denominados B4 e B5 amplificando um segmento de 233 pb de um gene que codifica uma proteína de 31 kDa. Descrevendo assim um teste robusto, sensível e específico para *B. abortus* e *B. melitensis*. DA COSTA et al. (1996) pesquisaram 98 bactérias que não pertenciam ao gênero *Brucella* e encontraram uma cepa que amplificou, pertencente ao *Ochrobactrum*. Em 1995 ROMERO et al. desenvolveram um teste com *primers* que amplificavam um produto de 905 bp derivado da sequência 16S rRNA de *B. abortus*. Utilizaram amostras clínicas e observaram que somente o biótipo D de *Ochrobactrum anthropi* produziu um produto de 905 bp.

BADDOUR & ALKHALIFA (2008) utilizando a PCR para realizar o diagnóstico da brucelose humana em sangue periférico, compararam três diferentes *primers* e três diferentes protocolos que amplificavam três diferentes fragmentos. Demonstraram que o *primer* B4/B5 obteve a maior sensibilidade para a detecção de amostras positivas (98%). Sendo que todas as técnicas utilizadas no trabalho apresentaram 100% de especificidade.

CORTEZ et al. (2001) buscando detectar a presença de *Brucella* spp. em fetos bovinos abortados, comparou a PCR, utilizando o *primer* B4/B5, o isolamento e a identificação bacteriana. Das 61 amostras, sete foram positivas para ambos os testes e quatro amostras foram positivas somente para a PCR, concluindo que a PCR é uma ferramenta adicional para o diagnóstico direto da brucelose de fetos bovinos abortados.

A utilização da PCR em animais selvagens no Brasil ainda é pouco utilizada. ELISEI et al. (2009) utilizaram a técnica da PCR para detectar *Brucella* spp. em 44 amostras de sangue de *Ozotoceros bezoarticus* no Pantanal do Mato Grosso do Sul, sendo que 20,4% (9/44) dos animais foram positivos.

Em muitos casos a determinação do gênero é suficiente, porém há casos em que é necessário conhecer o biovar envolvido para tomar ações devidas. Várias técnicas de PCR foram descritas para a diferenciação do gênero *Brucella* em espécies e biótipos. BRICKER & HALLING (1994) descreveram a AMOS PCR que representa as iniciais das espécies que a PCR é capaz de detectar (*B.*

abortus biovars 1, 2 e 4; *B. melitensis* 1, 2 e 3; *B. ovis* e *B. suis* biovar 1). A AMOS explora o polimorfismo decorrente da localização espécie-específica do elemento *IS711* no cromossomo de *Brucella* spp., através da utilização de cinco *primers*. A identidade é determinada pelo tamanho dos produtos amplificados a partir de quatro *primers* espécie-específicos pela distância do elemento *IS711* que é amplificado por meio do *primer* restante.

BRICKER & HALLING (1994) adicionaram três novos *primers* no teste da PCR multiplex AMOS, para a identificação das cepas vacinais B19 e RB51 utilizando os *primers* *ery1* e *ery2*. A detecção de B19 amplifica apenas um produto de 498 bp enquanto a RB51 e as outras espécies do gênero *Brucella* amplificam produtos de 498 bp e 364 bp. Isso ocorre devido a deleção de 702 bp que a cepa vacinal B19 sofreu na sequência de seu DNA.

VEMULAPALLI et al. (1999) descreveram a diferenciação entre a RB51 e as outras espécies e biovars do gênero *Brucella*. Durante a atenuação da RB51 ocorreu a inserção do elemento *IS711* (842 p) levando a interrupção da cadeia de nucleotídeos do gene *wboA*, que codifica a enzima glicosiltransferase responsável pela biosíntese do antígeno "O". Essa interrupção do gene *wboA* em cepas de fenótipo liso resulta na conversão do fenótipo liso em rugoso. Assim o fragmento amplificado de 400 bp identifica as espécies e biovars do gênero *Brucella* enquanto o produto amplificado de 1300 bp corresponde a RB51.

MAYER-SCHOLL (2010) descreveu uma técnica de PCR multiplex para a diferenciação de nove espécies de *Brucella* spp., incluindo as espécies *B. microti*, *B. inopinata*, *B. ceti* e *B. pennipediaлис*.

2.3.6.2 Diagnóstico indireto

A sorologia é amplamente utilizada para o diagnóstico da brucelose, sendo usada como ferramenta estratégica para proceder ao monitoramento e vigilância de áreas ou regiões onde a doença já foi identificada (ALTON et al., 1988). GODFROID (2002) descrevem que animais soropositivos não significam necessariamente que tenham uma infecção atual ou ativa no momento da

amostragem. Pois o teste sorológico permite apenas o diagnóstico presuntivo (MACKINTOSH et al., 2002).

Quase todas as espécies vulneráveis a infecção por *Brucella* spp. podem perder a titulação de anticorpos, podendo constituir uma maior prevalência de brucelose do que a indicado pela pesquisa dos anticorpos. Os anticorpos responsáveis por *B. abortus* em bovinos consistem de uma resposta inicial da IgM que é dependente da via de exposição, dose da bactéria e do estado sanitário do animal, seguida de uma produção quase que imediata de anticorpos IgG1 e depois a produção de pequenas quantidades das IgG2 e IgA (NIELSEN et al., 1984).

Os principais testes sorológicos detectam *Brucella* spp. de fenótipo liso, portanto não detecta *B. ovis* e *B. canis*, sendo para tanto necessário antígenos específicos de *Brucella* spp. do fenótipo rugoso (GOSFROID 2002; OIE 2000). Bactérias do gênero *Brucella* demonstram uma relação genética próxima de alguns patógenos de plantas, e simbioses do gênero *Agrobacterium* e *Rhizobium* e bem como, patógenos de animais e bactérias oportunistas ou do solo como o *Ochrobactrum* (OIE, 2009). Portanto, reações cruzadas podem ocorrer, e são principalmente derivadas dos anticorpos IgM (CORBEL, 1985). Os testes que detectam principalmente IgG1 são os mais úteis, porque os anticorpos IgG2 e IgA estão presentes em pequenas quantidades e as IgM não são desejáveis pois leva a resultados falsos positivos (NIELSEN et al., 1984).

Vários testes sorológicos estão disponíveis e os principais testes utilizados são os recomendados pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE). O Brasil possui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal que emprega o teste do AAT como teste de triagem e os animais que reagem a este teste são submetidos ao teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol (BRASIL, 2006). O AAT é um teste qualitativo rápido, prático, 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 (ALLAN et al., 1976; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003). Entretanto, reações falsas negativas podem ocorrer, principalmente devido ao fenômeno de prozona, ocorrendo quando a quantidade

de anticorpos presente na amostra de soro puro é desproporcional em relação à quantidade de antígeno do teste, gerando resultados falso-negativos no exame. (OIE, 2000). Anticorpos resultantes da vacinação com a B19 e alguns anticorpos cruzados são detectados por este teste, sendo necessário usar outros testes para confirmar o animal reator como infectado (BRASIL 2004; OIE 2000).

O 2-mercaptoetanol é utilizado como teste confirmatório, quantitativo seletivo que detecta somente a presença de IgG no soro. Apresenta compostos contendo radicais tiol que é o agente redutor adicionado ao soro do animal, reduzindo a IgM em subunidades pela redução das pontes dissulfídicas impedindo a formação da aglutinação. Entretanto, o teste aumenta a especificidade até certa extensão, podendo causar reações falsas positivas devido a presença de pontes dissulfídicas na IgG, conseguindo reduzir a um ponto onde a IgG é incapaz de aglutinar-se (BRASIL 2006; NIELSEN 2002).

O teste de fixação de complemento é o teste de referência para o trânsito internacional de animais, permitindo a detecção de anticorpos anti-*Brucella*, baseando-se na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento. Nos bovinos as imunoglobulinas IgG e IgM podem ativar o complemento, embora o isotipo IgG1 é muito mais efetivo como fixador de complemento. Permite também detectar precocemente a IgG1 no soro em torno do 14º dia, sendo que as provas de aglutinação o fazem ao redor do 30º (BRASIL, 2006).

O teste de Polarização da Fluorescência (FPA) é um teste padronizado para bovinos, suínos, bisão e cervídeos (GALL et al., 2001a). É um teste que foi desenvolvido para bovinos e o fundamento do teste é baseado no tamanho molecular, comparando a velocidade dos movimentos aleatórios das moléculas em solução, sendo a taxa de rotação inversamente proporcional ao tamanho da molécula. É preparado utilizando o polissacarídeo O de *B. abortus*, conjugado com o isotiocianato de fluoresceína. Havendo a presença de anticorpos no soro, se houver a formação do complexo antígeno-anticorpo-conjugado, cuja velocidade será inferior à do isolado antígeno-conjugado. A determinação da rotação é feito com o auxílio do equipamento de iluminação por luz polarizada (BRASIL 2006; NIELSEN 2002).

Muitos dos testes sorológicos não foram validados em animais selvagens, contudo várias investigações sorológicas têm sido feitas nestes animais de vida livre e em zoológicos, objetivando-se acessar a presença ou a disseminação de *Brucella* spp. em diferentes espécies selvagens e classificar as espécies ou indivíduos como expostos ou não expostos (GODFROID, 2002). Testes sorológicos utilizados para a detecção de anticorpos de *Brucella abortus* em bovinos têm sido usados para o diagnóstico de diferentes espécies de ungulados como o Caribu (*Rangifer tarandus caribou*), veado-vermelho (*Cervus elapus*) e gamo (*Dama dama*) (GODFROID, 2002) ou em inquéritos epidemiológicos (AGUIRRE et al., 1995; GOMO et al., 2011; MUMA et al., 2011). Muitos dos testes sorológicos não foram validados em animais selvagens. O teste da FPA já foi validado para a detecção de anticorpos em Bisão e cervídeos (GALL et al., 2000; GALL et al., 2001b).

2.4 Porcos ferais e a brucelose

Brucella suis é o agente que está mais relacionado aos porcos ferais em várias localidades onde as populações destes estão presentes. A primeira evidencia da infecção de *Brucella suis* em porcos ferais nos Estados Unidos foi descoberta no Hawaii em 1962, sendo mais tarde confirmada por cultura bacteriológica (WOOD et al., 1976; RHYAN 2013).

WOOD et al. (1976) descreveram que as altas taxas reprodutivas, movimentação do macho por grandes distâncias, compra e venda de porcos ferais, o potencial de interação dos porcos ferais com o homem e suínos domésticos são fatores consideráveis para a transmissão de *Brucella suis*. Foi observado que porcos ferais com mais de um ano de idade tem maior probabilidade de apresentarem títulos sorológicos do que animais com menos de seis meses de idade. Porém, GODFROID (2002) descreveram uma alta taxa de isolamentos independente da categoria idade e AL DAHOUK et al. (2005) não encontraram diferença estatística na diferença de idade e sexo.

Em vários países há trabalhos relativos a investigações sorológicas de *Brucella* spp. em suídeos selvagens (Tabela 1).

B. suis biovar 1 e 3 estão presentes na América do Norte enquanto *B. suis* biovar 2 está presente na Europa, sendo a patogênese e a patobiologia nos porcos ferais idêntica aos porcos domésticos (RHYAN, 2013). Porém, CVETNIC et al., (2003) descreveram que a brucelose em porcos pode ser latente, com nódulos granulomatosos ou abscessos nos testículos, fígado, baço e outros órgãos, que são frequentemente observados. AL DAHOUK et al. (2005) citaram que raramente javalis apresentam lesões macroscópicas, sendo a *B. suis* biovar 2 menos patogênica nos javalis comparado aos porcos domésticos.

A brucelose tem uma distribuição geral na Europa central e a presença de *B. suis* biovar 2 depende da população de javalis, contudo, as lebres marrons também são hospedeiras e disseminadoras deste biovar. A criação de javalis em recintos antes da liberação da caça na Alemanha ajudou a espalhar a brucelose suína nestes animais (GODFROID, 2002). Outros fatores que auxiliam na transmissão é o fato de ocorrer a transmissão venérea, contato dos integrantes do grupo com as membranas fetais, descargas pós-parto e o leite, já que as fêmeas podem amamentar os leitões de outra fêmea (GODFROID et al., 2005).

A transmissão de doenças dos porcos ferais para os suínos domésticos e bovinos é importante devido à importância econômica da produção destes (USDA, 2010), e ainda mais o risco de perder o status de país livre da brucelose. O papel dos porcos ferais na transmissão e manutenção de *B. suis* e *B. abortus* nos EUA são de grande importância devido à indústria envolvida com os animais de produção (PEDERSEN et al., 2014).

Tabela 1 – Locais onde foram realizadas soroprevalência em suídeos selvagens para brucelose.

AUTOR	SOROPREVALÊNCIA	LOCAL
DREW et al., 1992	23/611 (3,8%)	Califórnia, EUA
VAN DER LEEK et al., 1993	238/1.015 (23,4%)	Flórida, EUA
NEW et al., 1994	0/108	EUA
GRESHAM et al., 2002	227 (44% positivos)	Carolina do Sul, EUA
AL DAHOUK et al., 2005	168/763 (22%)	Alemanha
WATARAI et al., 2006	9/115 (7.8%)	Japão
RUIZ-FONS et al., 2006	29,7% (n=118)	Espanha
PAES et al., 2009	2/162 (1,2%)	Pantanal/Brasil
CORN et al., 2009	7/50 (14%)	Carolina do Sul, EUA
MONTAGNARO et al., 2010	15/342 (4,4%)	Itália
PILO et al., 2015	35/570 (6,1%)	Itália

HIGGINS et al. (2012) detectaram *Brucella abortus* em porcos ferais, e descreveram que são encontradas nos porcos ferais infectados nos locais onde há a presença endêmica de *B. abortus* nos rebanhos de bovinos. Como os testes sorológicos não diferenciam a espécie de *Brucella* spp., têm sido utilizados os linfonodos para a cultura e identificação das espécies de *Brucella* e a subsequente genotipagem para elucidar a relação entre os isolados baseado na similaridade do padrão do número variável de repetições em tandem (*Variable*

number tandem repeat-VNTR), sendo esta informação utilizada para examinar as diferenças geográficas e evolutivas no DNA das espécies de *Brucella* spp. e assim descobrir a fonte de infecção (PEDERSEN et al., 2014).

PEDERSEN et al. (2014) obtiveram 21 /183 amostras positivas na cultura de *Brucella* spp., sendo todos identificados pela PCR e VNTR como *B. suis*. E os biovars obtidos foram o 1 e o 3, a prevalência, por meio do teste de polarização fluorescente, foi de 28%, sendo que 11 dos animais positivos na cultura foram positivos na sorologia. Concluindo que o teste sorológico não foi um bom indicador da infecção, pois somente 52% dos soros que tinham animais positivos na cultura foram positivos.

STOFFREGEN et al. (2007) descreveram que os porcos ferais, juntamente com o veado-vermelho (*Cervus elaphus*) e o Bisão (*Bison bison*) são os reservatórios da brucelose nos EUA. Sendo os surtos mais recentes nas populações de suínos domésticos relacionados aos porcos ferais ou ao *C. elaphus* (DONCH, 2004).

STOFFREGEN et al. (2007) detectaram o biovar 1 de *B. abortus*, *B. suis* biovar 1 e as cepas vacinais B19 e RB51 nos porcos ferais. Sendo *B. abortus* encontrada em uma variedade de tecidos com a presença de bacteremia e distribuição sistêmica. A taxa de cultura nos animais foi alta, indicando a tendência destes suínos de desenvolverem infecções crônicas de *Brucella* spp. E ainda descrevem que a combinação dos dados de isolamento e sorologia foram de 54,1% com a associação de três testes sorológicos.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de La Salud. 3. Ed. Washington, p. 28-55, 2001.

ADAMOLI, J. Zoneamento ecológico do Pantanal baseado no regime de inundações. In: ENCONTRO SOBRE SENSORIAMENTO REMOTO APLICADO A ESTUDOS NO PANTANAL, 1., 1995, Corumbá. *Anais*. São José dos Campos: Inpe, 2005. p.15-17.

ADAMS, L. G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1-4, p. 553-61. 2002.

AGUIRRE AA, HANSENA ED, STARKEYB EE, MCLEAN RG. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, n.21, p.313-322. 1995.

AL DAHOUK, S.; et al. Seroprevalence of *Brucellosis*, Tularemia, and Yersiniosis in Wild Boars (*Sus scrofa*) from North-Eastern Germany. *Journal of Veterinary Medicine*, n.52, p. 444–455. 2005.

ALHO, C.J.R. et al. Mamíferos da Fazenda Nhumirim, sub-região de Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul: I - levantamento preliminar de espécies. *Revista Brasileira Zoologia*, v. 4, n. 2, p.151-164, 1987.

ALHO C.J.R., MAMEDE S., BITENCOURT K., BENITES M. Introduced species in the Pantanal: implications for conservation. *Brazilian Journal of Biology*. n.71, v.1, p. :321-325. 2011.

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

BUDDLE M.B. Studies on *Brucella ovis* (n. sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *The Journal of Hygiene*, n. 54, v. 3, p. 351–364. 1956.

ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P.; MACNAUGHT, D.J. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *The Journal of Hygiene*, v.76, p. 287-298, 1976.

ANDERSON, T. D.; CHEVILLE, N. F. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *The American Journal of Pathology*, v. 124, n. 2, p. 226-37. 1986.

BADDOUR, M. M.; ALKHALIFA, D. H. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 54, n. 5, p. 352-7. 2008.

BANAI, M.; CORBEL, M. Taxonomy of *Brucella*. *The Open Veterinary Science Journal*, v.4, p.85-101, 2010.

BATHKE, W. Brucellosis. In: Beer, J. Doenças Infecciosas em Animais Domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose. ROCA: São Paulo, v.2, p. 144-160, 1998.

BAILY G.G. et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n.95, p.271-275.1992.

BEJA-PEREIRA, A. et al. DNA genotyping suggests that recent brucellosis outbreaks in the Greater Yellowstone Area originated from elk. *Journal of the Wildlife Disease*, v. 45, n. 4, p. 1174-7. 2009.

BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine Brucellosis. In: Ceotzer, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. Infectious diseases of livestock. Texas: University Press, College Station, v.2, p. 1053-1066, 1994.

BRASIL. Legislação Agrícola Federal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 06 de 8 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. 2004. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, Página 6 de 12 de janeiro de 2004.

BRASIL. 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 192pp.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 11, p. 2660-6. 1994.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1-4, p. 435-46. 2002.

CAMPERO, C. M. et al. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 24, n. 3, p. 235-46. 1990.

CAMPOS, Z. M. S. Effect of habitat on survival of eggs and sex ratio of hatchlings of caiman (*Crocodilus yacare*) in the Pantanal , Brazil. *Journal of Herpetology*, v. 27, p. 127-132, 1993.

CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, v. 5, n. 13, 2006.

CARMICHEAL L.E.; BRUNER D.W. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Veterinarian Journal*, n.48, v.4, p.579–592. 1968.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. *Brucella*. In: CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. 3 ed. Philadelphia: London, p. 196-200, 1991.

CHATE S.C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n.61, p.46-55. 2009.

CLOECKAERT, A. et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infection*, v. 3, n. 9, p. 729-38, Jul 2001.

CLOECKAERT, A. et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*, v. 22, n. 21-22, p. 2827-35. 2004.

COMERCI, D. J. et al. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cellular Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 159-68. 2001.

CORBEL, M.J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reaction. *Veterinary Bulletin*, n.54, p.927-942. 1985.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Disease journal*, n.3, p.213-21.1997.

CORBEL, M. J.; ELBERG, S.S.; COSIVI, O. 1° Ed. Brucellosis in humans and animals. Geneva, Switzerland: WHO Press, p. 89, 2006.

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 of Wildlife Diseases*, n.5, v.3, p. 713–721. 2009.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R.M. et al. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. *Australian Veterinary Journal*, v.79, p.500-501, 2001

CRAWFORD, R. P.; ADAMS, L. G.; RICHARDSON, B. E. Effect of dose of *Brucella abortus* strain 19 in yearling heifers on the relative risk of developing

brucellosis from challenge exposure with strain 2308. *American Journal of Veterinary Research*, v. 51, n. 11, p. 1837-40. 1990.

CUNHA, N. G. Considerações sobre os solos da sub-região da Nhecolândia, Pantanal Mato-Grossense. Corumbá, MS: Embrapa-Uepae, 1980, 45p (Circular Técnica N. 1).

CVETNIC, Z., M. et al. Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. *Acta Veterinaria Hungarica*, n.51, 465–473. 2003.

DA COSTA, M. et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 81, n. 3, p. 267-75, Sep 1996.

DEBERDT, A.J., SCHERER, S.B. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. *Natureza & Conservação*. n.5, p.31–44. 2007.

DESBIEZ, A. L. J. Wildlife conservation in the Pantanal: habitat alteration, invasive species and bushmeat hunting. 2007. 288 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Biodiversity Management) - Durrell Institute of Conservation and Ecology (DICE), University of Kent, Canterbury. 2007.

DESBIEZ, A.L.J.; KEUROGHLIAN, A.; PIOVEZAN, U.; BODMER, R.E. Ecologia de populações de porco monteiro no Pantanal do Brasil. Dados eletrônicos. – Corumbá: Embrapa Pantanal, p. 44. 2009.

DNOS, Relatório Técnico Estudos Hidrológicos da Bacia do Alto Paraguai. *Programa das Nações Unidas para Desenvolvimento*, Rio de Janeiro. 1972. 284p.

DONCH DA: 2004, Cooperative state-federal brucellosis eradication program status report- fiscal year 2004. In: Proceedings 108th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, pp. 187–193. Pat Campbell & Associates, Richmond, VA.

DREW, M.L.; JESSUP, D.A.; BURR, A.A.; FRANTI, C.E. Serologic survey for brucellosis in feral swine, wild ruminants, and black bear of California, 1977 to 1989. *Journal of Wildlife Diseases*, n.28, v.3, p. 355-363. 1992.

EISENBERG, T. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and Environmental Microbiology*, n.10, v.78, p.3753-5. 2012.

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*, n.30, p.503-509. 2010.

ENRIGHT, F. M. et al. Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 26, n. 2, p. 171-82. 1990.

EWALT, D.R., PAYEUR J.B., MARTIN B.M., CUMMINS D.R. & MILLER W.G. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, n.6, v.4, p.448–452. 1994.

FORESTIER, C. et al. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 9, p. 21 5202-10. 2000.

GALL, D. et al. Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. *Journal of the wildlife diseases*, n.36, v.3, p.469-476. 2000.

GALL, D.; NIELSEN, K. Comparison of some methods for determining cutoff values for serological assays: a retrospective study using the fluorescence polarization assay. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, v. 22, n. 2, p. 85-98, 2001a.

GALL, D. et al. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *Journal of the wildlife diseases*, n.37, v.1, p.110-118. 2001b.

GOMO, C. et al. Survey of brucellosis at the wildlife-livestock interface on the Zimbabwean side of the Great Limpopo Transfrontier Conservation Area. *Tropical Animal Health and Production*. 2011.

GRECHAM, C.S. et al. Increased Prevalence of *Brucella suis* and Pseudorabies Virus Antibodies in Adults of an Isolated Feral Swine Population in Coastal South Carolina. *Journal of Wildlife Diseases*, n.38, v.3, p.653-656. 2002.

GRÉGOIRE, F. et al. A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Veterinary Research*. n.8, p80. 2012.

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

GODFROID, J. et al. 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. *Veterinary Research*. n.36, p.13–25. 2005.

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

GODFROID, J. et al. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, n.32, v.1, p. 27-42. 2013.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1-4, p. 281-97. 2002.

HIGGINS J. et al. Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolates from cattle, elk, and bison in the United States, 1998 to 2011. *Applied and Environmental Microbiology*, n.78, p.3674–3684. 2012.

HUBALEK Z., SCHOLZ H.C., SEDLACEK I., MELZER F., SANOGO Y.O.; NESVADBOVA J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne zoonotic Diseases*, n.7, v.4, p.679–687. 2007.

HUDDLESON I.F. The differentiation of the species of the genus *Brucella*. *Michigan State College Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, n.100, p. 1–16. 1929.

JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M. P. et al. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp. relationship to virulence *Infection and Immunity*, v. 72, n. 4, p. 2429-33. 2004.

JOHNSON, B. et al. Experimental *Brucella abortus* strain 19 arthritis in young cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 6, n. 1, p. 56-61.1994.

LAGE, A. P. et al. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. 1º ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p. 188, 2006.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, S. M.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose Bovina: Uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução animal*, v.32, n.3, p. 202-212. 2008.

LEAL FILHO, Jamil Manoel Leal. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Mato Grosso do Sul. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

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.

MATHIAS, L.A.; GIRIO, R.J.S.; DUARTE, J.M.B. Serosurvey for Antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in Pampas Deer from Brazil. *Journal of Wildlife Disease*, n. 35, p.112-114. 1999.

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, n. 1, p. 65-78. 2003.

LUCERO, N. E. et al. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology & Infection*, v. 136, n. 4, p. 496-503. 2008.

MACKINTOSH C., HAIGH J. C.; GRIFFIN F. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*. v.21, n.2, p. 249-263, 2002.

MAYER-SCHOLL, A. et al. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of Microbiological Methods*, v. 80, n. 1, p. 112-4. 2010.

MAYOR, P. et al. A health evaluation in a colony of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the Eastern Amazon. *Research in Veterinary Science*, v. 81, n. 2, p. 246-53. 2006.

MONTEIRO, L. A. R. C.; PELLEGRIN, A. O.; ISHIKAWA, M. M.; OSÓRIO, A. L.A. R. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do estado de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, n.4, p. 212-222. 2006.

MURI, A. F. et al. Piletas:  gua para o gado e para a fauna no Pantanal da Nhecolândia. Corumbá, S: Embrapa Pantanal, *Comunicado Técnico*, n.59, p. 5 2007.

MONTAGNARO, S. et al. Prevalence of Antibodies to Selected Viral and Bacterial Pathogens in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, n.46, v.1, p. 316–319. 2010.

MOURÃO G., COUTINHO M., MAURO R., TOMÁS W., MAGNUSSON W. Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos. Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. n.28, p.1-22. 2002.

MUMA, J. B. et al. Brucella seroprevalence of the Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) and Black lechwe (*Kobus leche smithemani*): exposure associated to contact with cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 100, n. 3-4, p. 256-60. 2011.

NEW, J.C. et al. A Serologic Survey of Selected Viral and Bacterial Diseases of European Wild Hogs, Great Smoky Mountains National Park, USA. *Journal of the Wildlife Diseases*, n.30, v.1, p.103-106. 1994.

NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.5-9, 2002.

NIELSEN, K. et al. Field trial of the brucellosis fluorescence polarization assay. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, v. 23, n. 3, p. 307-16, 2002.

NIELSEN, K. et al. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. *Preventive Veterinary Medicine*, v.2, p. 197-204, 1984.

OCAMPO-SOSA, A. A.; AGÜERO-BALBÍN, J.; GARCÍA-LOBO, J. M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Veterinary Microbiology*, v. 110, n. 1-2, p. 41-51. 2005.

OIE. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Bovine brucellosis. OIE, Paris, France, p. 328-345, 2000.

OIE. 2009- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponible em:
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf

OIE. World Organisation for Animal Health. *Training Manual on Wildlife Diseases and Surveillance*. Paris, France. P. 1-56. 2010.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité Mixto FAO/OMS de expertos em brucellosis. Genebra, OMS, *Série de informes técnicos*, n. 740, p. 149, 1986.

PACHECO DO AMARAL FILHO, Z. Solos do Pantanal Mato-grossense. In: Ed. Boock, SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS O PANTANAL, 1., 1986. Corumbá, **Anais...** Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1986. p. 91-103, Documento 5.

PAES, R.C.S. et al. Enfermidades de ocorrência no porco-monteiro (*Sus scrofa*) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. *Suiform Soundings*, n.1, v.9, p. 29-34. 2009.

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.

PAULIN, L.M. Brucelose. *Arquivo Instituto Biológico*, v.70, n.2, p.239-249. 2003.

PEDERSEN, K. et al. Identification of *Brucella suis* from feral swine in selected states in the USA. *Journal of Wildlife Diseases*, n.50, v.2, p. 171-179. 2014.

PEDROSA F., SALERNO R., PADILHA F.V.B., GALETTI M. Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. *Natureza & Conservação*. n.13, v.1, p.84-87. 2015.

PEI, J.; FICHT, T. A. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 1, p. 440-50. 2004.

PELLEGRIN, A. O. et al. Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares. *Comunicado técnico*. n.58, Corumbá, 1-4, 2006.

PILO, C.; ADDIS, G.; DEIDDA, M.; TEDDE, M.T.; LICCARDI, M. A Serosurvey for Brucellosis in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Sardinia, Italy. *Journal of the Wildlife Diseases*, n.51, v.4, p.885-888. 2015.

PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 7, p. 829-35. 2000.

POESTER, F. P. Brucelose animal. Anais 2. Simpósio Pfizer Sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos, Caxambu, Minas Gerais, p. 54-59, 1997.

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

POESTER, F. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, supl. 1, p.1-5, 2009.

POESTER, F.P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L.E. Diagnosis of brucellosis. *Open Veterinary Science Journal*, v. 4, p. 46-60, 2010.

PORTE, F. et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 3, p. 1481-90. 2003.

RHYAN, J.C. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in wildlife. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, n.32, v.1, p.127-136. 2013.

ROMERO, C. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, n.33, v.12, p.3198-200. 1995.

ROOP, R. M. et al. *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annual Review of Microbiology*, v. 57, p. 57-76, 2003.

RUIZ-FONS, F. et al. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, n.65, p. 731–743. 2006.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, p. 55-63. 1996.

SANTOS, R. L. et al. Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast. *Theriogenology*, v. 46, n. 6, p. 1077-83. 1996.

SCHOLZ H.C. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n.58, v.2, p.375–382. 2008.

SCHOLZ H.C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n.60, v.4, p.801–808. 2010.

SIEIRA, R. et al. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 17, p. 4849-55. 2000.

SILVA, J. S. V. e ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas subregiões. *Pesquisa Agropecuária*, v.33, Número Especial. Brasília. p. 1703-1711. 1998.

SILVA, M.P. et al. Conversion of forest and woodland to cultivated pastures the wetland of Brazil. *Ecotropicos*, n.12, p.101-108. 1999.

SOUZA, C.A. e CUNHA, S. B. *Dinâmica das águas no Pantanal Mato-Grossense Pantanal*. Mato-grossense. Revista Ação Ambiental. Pró-Reitoria de Extensão e Cultura – Universidade Federal de Viçosa. Ano VI. N. 26 (janeiro/fevereiro de 2004). Viçosa. 2004.

SOUZA, C.A.; LANI, J.L.; SOUSA, J.B. Origem e evolução do Pantanal Mato-Grossense. VI Simpósio Nacional de Geomorfologia/Regional Conference on Geomorphology. Corumbá/MS. 2006.

STOENNER H.G.; LACKMAN D.B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *American Journal of Veterinary Research*, n.18, v.69, p. 947–951. 1957.

STOFFREGEN W.C. et al. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, n.19, p.227–237. 2007.

TESSARO, S. V. The existing and potential importance of brucellosis and tuberculosis in canadian wildlife: a review. *Canadian Veterinary Journal*, v. 27, n. 3, p. 119-24. 1986.

TILLER, R.V. et al. Characterization of Novel *Brucella* Strains Originating from Wild Native Rodent Species in North Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 17, v.76, p.5837-5845. 2010.

TRICHARD, C. J. et al. Unilateral orchitis in a bull caused by *Brucella abortus* biotype1. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 53, n. 1, p. 60-2. 1982.

TRUJILLO, I. Z.; ZAVALA, A. N.; CACERES, J. G.; MIRANDA, C. Q. Brucellosis Infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.8, p. 225–241, 1994.

USDA, National Agricultural Statistics Service. *Agricultural Statistics 2010*, pp.VII-1–58. 2010.

VAN DER LEEK, M.L. et al. Prevalence of *Brucella* sp. antibodies in feral swine in Florida. *Journal of the Wildlife Disease*, n.29, v.3, p. 410-415. 1993.

VEMULAPALLI, R. et al. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology Journal*, v. 6, n. 5, p. 760-4.1999.

WATARAI, M. et al. Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v.70, p. 4818–4825. 2002.

WATARAI, M.; ITO, N.; OMATA, Y.; ISHIGURO, N. A serological survey of *Brucella* spp. free-ranging wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) in Shikoku, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, n.68, v.10, p. 1139-1141. 2006.

WHATMORE, A.M. et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, n. 64, v.12, p. 412-4128. 2014.

WYATT, H.H. Lessons from the history of brucellosis. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, n.32, v.1, p.17-25. 2013.

WOOD, G.W.; HENDRICKS, J.B.; GOODMAN, D.E. Brucellosis in feral swine. *Journal of Wildlife Diseases*, v.12, 1976.

YANAGI, M.; YAMASATO, K. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiology Letters*, n.107, v.1, p.115-120. 1993.

YU, W. L.; NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croatian Medical Journal*, v. 51, n. 4, p. 306-13. 2010.

ARTIGO

Frequência sorológica de *Brucella* spp. em porcos ferais e bovinos em simpatria no Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil.

Namor P. Zimmermann^{2*}, Igor Alexandre H. F. S. Péres³, Raquel S. Juliano³, Aiesca O. Pellegrin³

ABSTRACT.- Zimmermann N. P., Péres I. A. H. F. S., Juliano R. S., Pellegrin A.O. 2015.

[Sorologic frequency of *Brucella* spp. in sympatric feral pigs and cattle in the Pantanal of Mato Grosso do Sul State, Brazil.] Frequência sorológica de *Brucella* spp. em porcos ferais e bovinos em simpatria no Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller, nº 2443, Bairro Vila Ipiranga, Caixa Postal: 549, Campo Grande, MS. *Autor para correspondência: namorvet@gmail.com

Currently, the feral pig population is expanding and may be the reservoir for several viral and bacterial agents that cause disease in farm animals. In Brazil there are still no studies relating the frequency of brucellosis in feral pigs and cattle living in sympatry. The objective of this study was to evaluate the frequency of anti-*Brucella* antibodies using three serological tests in feral pigs and bovine that inhabit the same rural properties in two Pantanal regions in the State of Mato Grosso do Sul. Nine rural properties were used in the municipality of Corumbá, comprising the sub-regions Nhecolândia and Paiaguás. A total of 105 feral pigs and 256 cattle were sampled, all animals were collected blood samples for the serological diagnosis. The frequency of the positive serology in feral pigs was 1% (1/105) in the buffered acidified antigen test (AAT), no positive feral pigs in the confirmatory test 2-Mercaptoethanol test (ME) and 1% (1/105) in the test Fluorescence polarization Assay (FPA). The positive frequency in the sampled cattle was 11.32%, 4.3% and 7.42% in the AAT, 2-ME and FPA tests, respectively. The frequency in the herds with at least one positive animal on the property was 77.77% (7/9) and 100%, considering the results of 2-ME and FPA. The degree of agreement obtained between the 2-ME serological test and the FPA used in cattle was Kappa = 0.506 ($p < 0.001$), 95% CI (0.282 - 0.729), which was considered a median concordance. According to the results, we conclude that feral pigs living in the same locations of seropositive bovines for brucellosis have a low exposure to *Brucella* spp. according to the serological tests used in this study. The only positive feral pig was located in the same property where there was the highest frequency of serologically positive cattle.

INDEX TERMS: Brucellosis, serological diagnosis, antibodies, free-living pigs, herd.

RESUMO: Atualmente, a população de porcos ferais está em expansão e pode ser reservatório de vários agentes virais e bacterianos que causam doenças em animais de produção, no Brasil ainda não há trabalhos relacionando a frequência de brucelose em porcos ferais e bovinos que vivem em simpatria. Objetivou-se neste trabalho a avaliação da frequência de anticorpos anti-*Brucella*, por meio de três testes sorológicos, em porcos ferais e bovinos que habitam as mesmas propriedades rurais em duas sub-regiões do Pantanal no Estado de Mato Grosso do Sul. O estudo foi conduzido em nove propriedades rurais no município de Corumbá no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, compreendendo as sub-regiões pantaneiras Nhecolândia e Paiaguás. Foram capturados 105 porcos ferais e amostrados 256 bovinos, em todos os animais foram coletadas amostras de sangue para o diagnóstico sorológico. A frequência de porcos ferais positivos na sorologia foi de 1% (1/105) no teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), nenhum porco feral positivo no teste confirmatório 2-Mercaptoetanol (ME) e 1% (1/105) no teste de polarização fluorescente (PFA). A frequência de positivos nos bovinos amostrados foi de 11,32%, 4,3% e 7,42% nos testes AAT, 2-ME e FPA respectivamente. A frequência nos rebanhos com ao menos um animal positivo na propriedade foi de 77,77% (7/9) e 100%, considerando os resultados do 2-ME e da FPA. O grau de concordância obtido entre os testes sorológicos 2-ME e a FPA utilizado nos bovinos foi de Kappa=0,506 ($p < 0.001$), 95% CI (0.282 - 0.729), sendo este valor considerado como uma concordância mediana. De acordo com os resultados concluímos que os porcos ferais que vivem nas mesmas localidades dos bovinos soropositivos para brucelose possuem uma baixa exposição à *Brucella* spp. segundo os testes sorológicos utilizados neste trabalho, sendo que o único porco feral positivo estava localizado na mesma propriedade onde havia a maior frequência de bovinos sorologicamente positivos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose, diagnóstico sorológico, anticorpos, suídeos de vida livre, rebanho.

INTRODUÇÃO

No Brasil, os porcos ferais estão presentes em 472 municípios e em quatro das cinco regiões políticas do país, com tendências de expansão (Pedrosa et al., 2015). As formas ferais de *Sus scrofa* estão entre as espécies exóticas mais prejudiciais (Lowe et al., 2000), devido aos impactos causados na agricultura e ambientes naturais, por meio de danos causados as lavouras, transmissão de doenças e destruição e predação de ninhos e espécimes de animais silvestres.

No ano 2000 o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) iniciou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) delineando estratégias de combate à brucelose e tuberculose em âmbito nacional (BRASIL, 2006). Aliado as estratégias de combate destas doenças deve ser considerada as informações epidemiológicas da participação dos animais de vida livre, pois o plano de controle não leva em consideração a coexistência e epidemiologia que possa estar envolvida entre os animais de vida livre e os animais domésticos.

Porcos ferais, como todos os animais selvagens ou domésticos, também estão susceptíveis a doenças, porém estes são reservatórios de vários agentes virais e bacterianos que causam doenças em animais de produção e humanos (Ruiz-Fons et al., 2008; Meng et al., 2009). Entre estas doenças a brucelose suína, causada pela *Brucella suis*, é extensamente relatada em porcos ferais em vários países (Drew et al., 1992; Godfroid 2002; Leiser et al., 2013). *Brucella abortus* também é descrita em porcos ferais que habitam locais endêmicos em simpatria com os bovinos (Stoffregen et al., 2007).

No Pantanal, os porcos ferais convivem no mesmo ambiente dos bovinos (Mourão et al., 2002), sendo esta região endêmica para a brucelose nos bovinos (Pellegrin et al., 2006; Chate et al., 2009). Portanto, o levantamento da frequência sorológica nos porcos ferais é o primeiro passo para a compreensão da epizootiologia da brucelose na região e a comparação com a exposição de bovinos ao agente (Leiser et al., 2013).

Objetivou-se neste trabalho a avaliação da frequência de anticorpos anti-*Brucella*, por meio de três testes sorológicos, em porcos ferais e bovinos que habitam as mesmas propriedades rurais em duas sub-regiões do Pantanal no Estado de Mato Grosso do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo. O estudo foi conduzido no município de Corumbá no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. A área de captura compreendeu duas sub-regiões do Pantanal, Nhecolândia e Paiaguás (Figura 1). As duas regiões apresentam uma alta densidade de porcos ferais e possuem a presença de outros animais silvestres e domésticos. É estimada uma abundância de cerca de 9.800 (erro padrão de 1.400) grupos de porcos ferais em todo o Pantanal (Mourão et al., 2002). Os pontos onde ocorreram as capturas compreenderam nove propriedades rurais particulares de gado de corte e a criação de outras espécies domésticas.

Animais. De maio de 2013 a janeiro de 2015 foram capturados 105 porcos ferais adultos (66 fêmeas, 28 machos e 11 machos castrados) e coletadas as amostras de 256 bovinos nas duas sub-regiões do Pantanal. O tamanho da amostra dos animais foi calculado levando em consideração o tamanho da população estimado de porcos ferais e bovinos com um grau de confiança de 95%, erro de 10% e uma proporção de 50%. Foi amostrada uma média de 30 bovinos e 11 porcos ferais em cada uma das nove propriedades rurais.

Capturas. Todos os animais foram capturados de forma aleatória, sem considerar fatores como sexo, idade e localização geográfica. Quando os porcos ferais eram localizados a equipe se aproximava dos animais com a ajuda de uma caminhonete 4x4 e em seguida com o auxílio de um laço eram capturados e amarrados para a completa contenção física. Posteriormente os porcos ferais eram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina 10%, cetamina 5% e midazolam e reversão da xilazina utilizando ioimbina (Zimmermann, 2015). Durante a anestesia foram aferidas temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória, reflexos, oximetria e pressão sanguínea a cada 10 minutos, além da inspeção clínica.

Identificação dos animais. Uma ficha padronizada foi utilizada para registrar o local de captura e as informações específicas de cada porco feral. Todos os porcos ferais foram identificados com brincos numerados para não repetir a captura do mesmo animal.

Obtenção do material biológico. A coleta de sangue foi feita por meio da venopunção da veia safena lateral dos porcos ferais. Nos bovinos o sangue foi coletado através da punção da veia jugular. As amostras coletadas foram armazenadas em isopor com gelo para o transporte até o local

de triagem. Após a completa retração do coágulo, os tubos eram centrifugados a 3000 rpm/10 minutos para a obtenção do soro. Em seguida o soro foi armazenado em freezer a -20°C.

Diagnóstico sorológico. Os testes sorológicos compreenderam a triagem com o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e o teste confirmatório 2-Mercaptoetanol (2-ME) segundo BRASIL (2006). O teste de polarização fluorescente (FPA) foi utilizado como descrito no manual do kit de diagnóstico (BRUCELLA FPA®, Estados Unidos) na diluição de 1:50, sendo que amostras com um resultado de 20 unidades de milipolarização (mP) a mais do que a média do controle negativo foram consideradas positivas.

Estatística. Para medir o grau de concordância entre os testes sorológicos 2-ME e FPA foi utilizado o teste estatístico de Kappa. O qual foi calculado e interpretado segundo LANDIS & KOCK (1977): 0 - 0,20 = ruim; 0,21 - 0,40 = fraca; 0,41 - 0,60 = média; 0,61 - 0,80 = boa; e 0,81 - 1 = excelente.

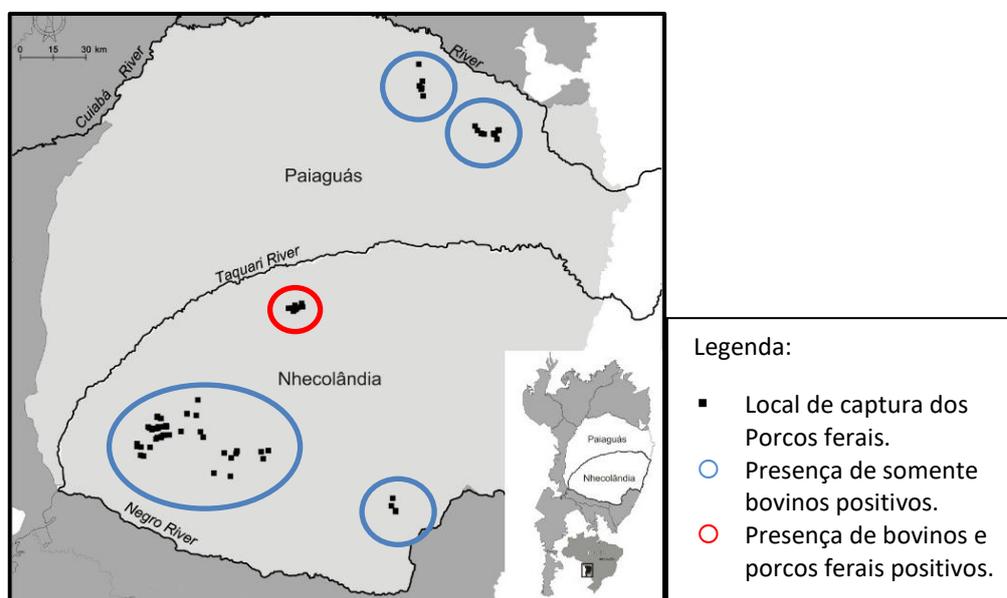
RESULTADOS

Os resultados sorológicos com base nas 105 amostras dos porcos feris apresentaram frequência de 1% (1/105) para o AAT, bem como para a FPA e não foram obtidas amostras positivas no teste confirmatório do 2-ME.

Do total de soros bovinos submetidos ao AAT, foi obtida uma frequência de 11,32% (29/256) de positivos. Após o diagnóstico confirmatório com o teste 2-ME essa porcentagem diminuiu para 4,3%. A frequência nos rebanhos, com ao menos um animal positivo na propriedade, foi de 77,77% (7/9), sendo que duas fazendas não apresentaram nenhum bovino amostrado positivo no teste sorológico do 2-ME. Na FPA foi obtida uma frequência de bovinos positivos de 7,42% e frequência nos rebanhos de 100%.

O grau de concordância obtido entre os testes sorológicos 2-ME e a FPA utilizado nos bovinos foi de Kappa=0,506 ($p < 0.001$), 95% CI (0.282 - 0.729). Este valor é considerado como uma concordância mediana.

Figura 1 – Mapa das duas sub-regiões do Pantanal. Com a indicação dos animais positivos e negativos.



DISCUSSÃO

A frequência sorológica dos porcos feris foi de 1%, sendo esta frequência influenciada por vários fatores, como a diferenças entre as localidades amostradas, variação temporal e técnicas de diagnóstico utilizadas, podendo ainda ocorrer grande variação nos percentuais de animais soropositivos para brucelose nas populações de porcos feris, como a registrada nos Estados Unidos,

variando de 0,3% a 52,6% (Leiser et al., 2013). Paes et al. (2009) obteve uma frequência de 1,2% em porcos ferais (2/162) no mesmo local deste estudo, sendo, portanto, proporcional a frequência obtida no presente trabalho.

A propriedade onde foi obtido o porco feral, positivo no teste da FPA, é a que foi detectada com a maior frequência de bovinos positivos, com 9,09% e 11,4% respectivamente para os testes PFA e 2-ME.

Muitas vezes o percentual de animais positivos pode ser maior do que o demonstrado nos testes sorológicos, pois Stuart et al. (1987) testando a infecção experimental com *B. abortus* demonstrou que mesmo suínos inoculados experimentalmente falham na resposta de soroconversão, inclusive excretando persistentemente *Brucella abortus* da vagina, contribuindo assim para uma menor frequência sorológica nestes animais.

Porcos ferais positivos por meio do isolamento também podem ser negativos sorologicamente Stoffregem et al. (2007) identificaram que a soroprevalência em suínos ferais é mais baixa do que a taxa verdadeira de infectados, com a presença de animais positivos na cultura e negativos na sorologia, além dos resultados mostrarem uma falta de sensibilidade no teste diagnóstico de brucelose em porcos ferais avaliados individualmente. Ray (1979) confirma que o teste em indivíduos não é o ideal e observou que em suínos, os títulos de anticorpos tendem a declinar mais rapidamente em comparação aos bovinos (Ray, 1979). Com isso muitas vezes o uso da sorologia não retrata a real frequência do contato dos porcos ferais com *Brucella* spp., sendo recomendado não usar somente a sorologia como reflexo da exposição dos porcos ferais ao agente.

A frequência obtida a partir dos resultados do 2-ME nos bovinos foi menor em indivíduos e maior em rebanhos em comparação com os dados descritos por Filho et al. (2013) de 8,9% e 39,1% para indivíduos e rebanhos na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul. Já as frequências obtidas no teste de FPA tanto para os bovinos amostrados quanto para os rebanhos foram maiores em comparação com o 2-ME, com 100% de rebanhos positivos. Isso demonstra que a brucelose está bem disseminada na região, o que também foi observado por Pellegrin et al. (2006) e Monteiro et al. (2006). A concordância dos testes sorológicos utilizados nos bovinos foi mediana, sendo esta diferença principalmente devido a sensibilidade e a especificidade dos testes utilizados (Nielsen et al., 1999; Mathias et al., 2010).

Os resultados da sorologia demonstraram que a brucelose está presente nos rebanhos bovinos amostrados ou em sua maior parte, o mesmo não ocorreu nos porcos ferais que habitam os mesmos locais que estes bovinos, seja pela baixa frequência nestes animais ou a dificuldade dos testes sorológicos detectarem os anticorpos anti-*brucella* devido às características do agente nos porcos ferais (Leiser et al., 2013). Desse modo as investigações epidemiológicas devem envolver níveis adicionais de complexidade para um melhor conhecimento do agente na população de porcos ferais (Leiser et al., 2013).

CONCLUSÕES

Neste trabalho, concluímos que os porcos ferais que vivem nas mesmas localidades dos bovinos soropositivos para brucelose possuem uma baixa exposição à *Brucella* spp. segundo os testes sorológicos AAT, 2-ME e PFA utilizados neste trabalho, sendo que o único porco feral positivo estava localizado na mesma propriedade onde havia a maior frequência de bovinos positivos.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). 188 p.
- 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. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 61(1):46-55.
- Drew, M.L.; Jessup, D.A.; Burr, A.A.; Franti, C.E. 1992. Serologic survey for brucellosis in feral swine, wild Ruminants, and Black Bear of California, 1977 to 1989. Journal of wildlife diseases. 28(3):355-363.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2009. Porcine brucellosis (*Brucella suis*) 1 Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. The EFSA Journal. 1114:1-112.

- Filho, Jamil Manoel Leal. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Mato Grosso do Sul. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.
- Godfroid, J.; Nielsen, K.; Saegerman, C. 2010. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal*. 51(4):296-305.
- Landis, J.R.; Koch, G.G. 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 33(1):159-174.
- Leiser O.P., Corn J.L., Schmit B.S., Keim P.S., Foster T.F. 2013. Feral swine brucellosis in the United States and prospective genomic techniques for disease epidemiology. *Veterinary Microbiology* 166:1–10.
- 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.
- Mathias, L. A.; Corbellini, L.G.; Maia, L.; Nascimento, K.F.; Paulin, L.M.S.; Samartino, L.E.; Serqueira, M.A.; Filho, P.M.S.; De Souza, M.M.A. 2010. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Ciência Rural*. 4(10):2135-2140.
- Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *The Royal Society*. 364:2697-2707.
- Monteiro, L.A.R.C.; Pellegrin, A.O.; Ishikawa, M.M.; Osório, A.L.A. R. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 26, n.4, p.217-222, 2006.
- Mourão G., Coutinho M., Mauro R., Tomás W., 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*. 28:1-22.
- Nielsen K., Gall D., Smith P., Vigliocco A., Perrez B., Samartino L., Dajer A., Elzer P. & Enright F. 1999. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 68, 245–253.
- PAES, R.C.S. et al. Enfermidades de ocorrência no porco-monteiro (*Sus scrofa*) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. *Suiform Soundings*, n.1, v.9, p. 29-34. 2009.
- Pedrosa F., Salerno R., Padilha F.V.B., Galetti M. 2015. Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. *Natureza & Conservação*. 13(1):84-87.
- Pellegrin, A.O.; Leite, R.M.H.; Sereno, J.R.B.; Lage, A.P.; Leite, R.C.; Ravaglia, E. 2006. Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares. *Comunicado Técnico 58. Embrapa Pantanal, Corumbá-MS*. p. 1-4.
- Ray WC, 1979. Brucellosis (due to *Brucella abortus* and *suis*). In: Steele J, ed. *Handbook Series in Zoonoses. Section A: Bacterial, Rickettial and Mycotic Diseases*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc., 99-127.
- Ruiz-Fons, F.; Vicente, J.; Vidal, D.; Hofle, U.; Villanúa, D.; Gauss, C.; Segales, J.; Almería, S.; Montoro, V.; Gortázar, C. 2006. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*. 65:731-743.
- Stoffregen W.C., Olsen S.C., Wheeler C.J., Bricker B.J., Palmer M.V., Jensen A.E., Halling S.M., Alt D.P. 2007. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 19:227–237.
- Stuart F.A., Corbel M.J., Brewer R.A. 1987. Experimental *Brucella abortus* Infection in Pigs. *Veterinary Microbiology*. 14:365-379.
- Zimmermann, N.P. Uso da associação de cloridrato de xilazina, cloridrato de ketamina e cloridrato de midazolam para a contenção química de porcos-ferais. Dados não publicados.

Isolamento e detecção do DNA de *Brucella* spp. em porcos ferais no Pantanal do Mato Grosso do Sul

Namor P. Zimmermann^{2*}, Igor Alexandre H. F. S. Péres³, Raquel S. Juliano³, Aiesca O. Pellegrin³

ABSTRACT.- Zimmermann N. P., Péres I. A. H. F. S., Juliano R. S., Pellegrin A.O. 2015.

[Isolament and DNA detection of *Brucella* spp. in feral pigs in the Pantanal of Mato Grosso do Sul.] Isolamento e detecção do DNA de *Brucella* spp. em porcos ferais no Pantanal do Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller, nº 2443, Bairro Vila Ipiranga, Caixa Postal: 549. Campo Grande, MS. *Autor para correspondência: namorvet@gmail.com

With the trend of increase in the population of wild boar (*Sus scrofa*) and the presence of feral pigs in nine Brazilian states, diagnosis and sanitary monitoring of these populations is necessary. In this context, there is still no epidemiological information, isolation and identification of *Brucella* species and its relationship with feral pigs present in the same environment of cattle in the Pantanal. The objective of this work was the isolation and detection of *Brucella* spp. in different biological samples collected in feral pigs in the Pantanal of Mato Grosso do Sul State. The study was conducted in nine farms in the municipality of Corumbá in the Mato Grosso do Sul State, Brazil, comprising two sub-regions of the Pantanal, Nhecolândia and Paiaguás. 52 feral pigs were sampled and biological materials collected for the isolation and molecular diagnosis of *Brucella* spp. The isolating characteristic was obtained in eight animals. In all these cultures, DNA detected the genus *Brucella*, by qPCR using the primer *IS711*. The acquired product in qPCR, from the colony obtained from a nasal swab, the Nested PCR was performed, which also detected the DNA. The DNA sample sequenced the colony obtained a 100% agreement with the sequence of *Brucella* genus by BLAST analyzing. DNA detection of *Brucella* spp. was obtained from 15 feral pigs. According to the results this is the first isolation and confirmation of *Brucella* spp. in feral pigs of free life in Brazil. There is the presence of *Brucella* spp. in feral pigs in the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State and these animals may be acting as reservoir of *Brucella* spp.

INDEX TERMS: brucellosis, diagnosis, wild pigs, cattle, sorology, polymerase chain reaction.

RESUMO: Com a tendência do aumento da população de javalis (*Sus scrofa scrofa*) e a presença de porcos ferais em nove estados brasileiros é necessário o diagnóstico e monitoramento sanitário destas populações. Neste contexto, ainda não se tem informações da epidemiologia, isolamento e identificação das espécies de *Brucella* e a sua relação com os porcos ferais presentes no mesmo ambiente dos bovinos no Pantanal. Objetivou-se neste trabalho o isolamento e detecção do DNA de *Brucella* spp. em diferentes amostras biológicas coletadas em porcos ferais no Pantanal de Mato Grosso do Sul. O estudo foi conduzido em nove propriedades rurais no município de Corumbá no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, compreendendo duas sub-regiões do Pantanal, Nhecolândia e Paiaguás. Foram utilizadas amostras biológicas de 52 porcos ferais para o isolamento e diagnóstico molecular de *Brucella* spp. Sendo obtido o isolamento característico de *Brucella* spp. em oito animais. Em todas estas culturas foram detectados o DNA do gênero *Brucella*, por meio da qPCR, utilizando o primer *IS711*. Do produto adquirido na qPCR, proveniente da colônia obtida de um swab nasal, foi feita a Nested PCR, na qual também se detectou o DNA. A amostra de DNA da colônia sequenciada obteve uma concordância de 100% com a sequência do gênero *Brucella* por meio da análise no BLAST. A detecção do DNA de *Brucella* spp. foi obtida em 15 porcos ferais. De acordo com os resultados este é o primeiro isolamento e confirmação de *Brucella* spp. em porcos ferais de vida livre no Brasil. Há a presença de *Brucella* spp. nos porcos ferais na região do Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul e estes animais podem estar atuando como reservatório de *Brucella* spp.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: brucelose, diagnóstico, porcos selvagens, bovinos, reação em cadeia da polimerase.

INTRODUÇÃO

As espécies de *Brucella* são patógenos Gram-negativos, parasitas intracelulares facultativos, que acometem várias espécies de animais domésticos e selvagens, além dos humanos (Godfroid et al., 2013). Dentre as espécies afetadas, os porcos-ferais (*Sus scrofa*) conhecidos também como porcos domésticos asselvajados têm tido um papel importante como reservatórios de ao menos 30 doenças virais e bacterianas (Seward et al., 2004), incluindo *Brucella suis*, atuando na transmissão e manutenção (Godfroid et al., 2013; Pedersen et al., 2014).

As espécies invasoras exóticas de porcos ferais têm ganhado importância devido à capacidade em invadir e adaptar-se em novas áreas (Alho et al., 2011). No Pantanal, os porcos ferais, conhecidos localmente como porco-monteiro foram introduzidos há aproximadamente 200 anos, sendo originários dos suínos domésticos trazidos por colonizadores e encontrados em praticamente toda a planície pantaneira (Mourão et al., 2002). Estes animais têm sido descritos como portadores de agentes infecciosos, podendo transmitir doenças para as espécies silvestres e/ou domésticos (Alho et al., 2011; GISD, 2007).

O diagnóstico e monitoramento de agentes de importância econômica e da saúde em populações de suídeos exóticos são de grande importância devido ao Programado Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), além do mais, é necessária uma maior atenção na avaliação de espécies exóticas que possam interferir na dinâmica do PNCEBT (Brasil 2006; Motta et al., 2010).

Em alguns países já é feito o monitoramento e estudo epidemiológico da brucelose relacionada à distribuição e mapeamento da população de porcos ferais (Leiser et al., 2013). Isto, devido principalmente ao aumento da população de porcos ferais e javalis, elevando o risco de alguns patógenos se espalharem juntamente com estes animais e pondo em risco as criações de animais domésticos e as pessoas relacionadas à caça e manipulação destes suídeos (Leiser et al., 2013).

Com a tendência do aumento da população de porcos selvagens no Brasil (Pedrosa et al., 2015) é necessário um plano de diagnóstico e monitoramento sanitário destas populações. Neste contexto, ainda não se tem informações da epidemiologia, isolamento e a relação de *Brucella* spp. com os porcos ferais no Brasil.

Objetivou-se neste trabalho o isolamento e detecção do DNA de *Brucella* spp. em diferentes amostras biológicas coletadas em porcos ferais no Pantanal de Mato Grosso do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo. O estudo foi conduzido no município de Corumbá no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. A área de captura compreendeu duas sub-regiões do Pantanal, Nhecolândia e Paiaguás (Figura 1). As duas regiões apresentam uma alta densidade de porcos ferais e possuem a presença de outros animais silvestres e domésticos. É estimada uma abundância de cerca de 9.800 (erro padrão de 1.400) grupos de porcos ferais em todo o Pantanal (Mourão et al., 2002). Os pontos onde ocorreram as capturas compreenderam nove propriedades rurais particulares de gado de corte e a criação de outras espécies domésticas.

Animais. De maio de 2013 a janeiro de 2015 foram capturados 105 porcos ferais adultos nas duas sub-regiões do Pantanal. Do total dos animais capturados, foram processadas as amostras de 52 animais (34 fêmeas, 12 machos e 6 castrados).

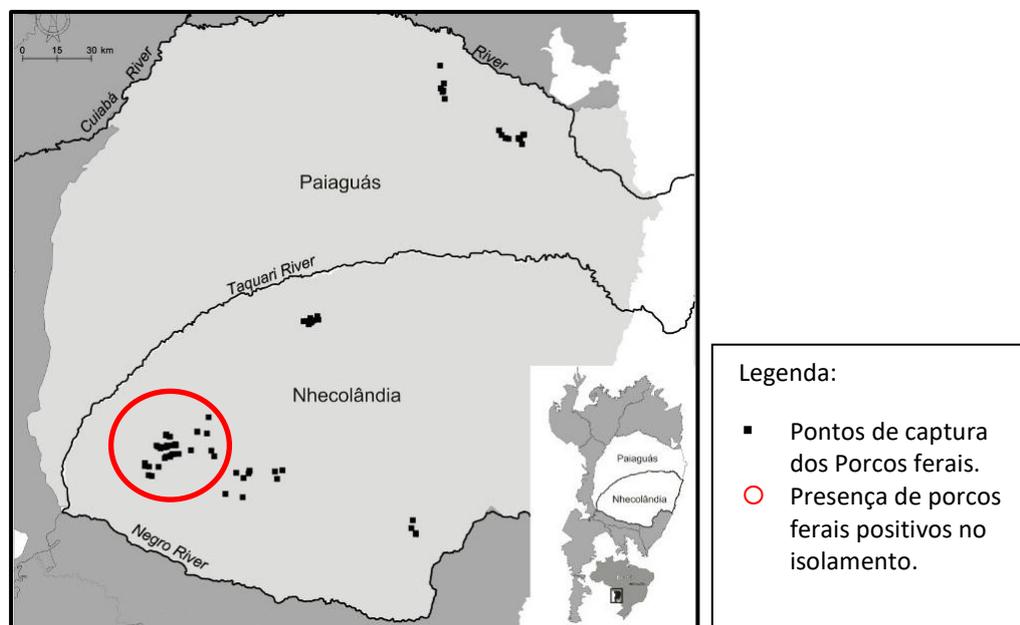
Capturas. Todos os animais foram capturados de forma aleatória, sem considerar fatores como sexo, idade e localização geográfica. Quando os porcos ferais eram localizados pela equipe, foi feita a aproximação e em seguida a captura com o auxílio de um laço ou manualmente, em seguida foram amarrados os membros para a completa contenção física. Posteriormente os porcos ferais eram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina 10%, cetamina 5%, midazolam e reversão da xilazina utilizando ioimbina (Zimmermann, 2015). Durante a anestesia foram aferidos temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória, reflexos, oximetria e pressão sanguínea a cada 10 minutos.

Identificação dos animais. Uma ficha padronizada foi utilizada para registrar o local de captura e as informações específicas de cada porco feral. Todos os porcos ferais foram identificados com brincos numerados para não repetir a captura do mesmo animal.

Obtenção do material biológico. Utilizou-se o swab com meio de transporte Stuart (Absorve®) para as amostras de swab vaginal, swab anal e swab nasal. Foi feita a punção aspirativa com agulha fina (PAAF) do linfonodo cervical superficial e coleta de leite. As amostras coletadas eram

armazenadas em isopor com gelo para o transporte até o local de triagem, onde eram armazenadas em geladeira ou freezer a -20°C .

Figura 1 – Mapa das sub-regiões do Pantanal. Locais de captura dos porcos ferais e a respectiva área onde foram capturados os animais positivos no isolamento.



Necropsia. Foram necropsiados oito animais, sendo os mesmos selecionados de forma aleatória. Para a eutanásia utilizou-se cloreto de potássio 19,1% administrado por meio de injeção intracardíaca após a anestesia geral. Foram coletados linfonodos cervical superficial, baço, fígado, rim, ovários, placenta, útero e fetos.

Cultura bacteriológica. As amostras de swabs obtidas foram plaqueadas diretamente nos meios de cultura. As amostras de tecido foram maceradas e homogeneizadas, sendo que aproximadamente 100 μl de cada amostra foi plaqueada utilizando-se um swab de algodão estéril. Os meios utilizados no isolamento foram o de ágar triptose contendo 5% de soro fetal bovino (Brucella médium base, Thermo Scientific) e o meio seletivo de Farrel (Oxoid® Brucella selective supplement, Thermo Scientific). As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 durante 14 dias (Alton et al., 1988).

Identificação das colônias. As culturas suspeitas foram identificadas com base na morfologia, características de crescimento e crescimento no meio seletivo. Em todas as culturas suspeitas foi realizada a PCR em tempo real (qPCR) para a confirmação. Em todas as amostras de tecido e swab também foram submetidas a qPCR. O animal foi considerado positivo se ao menos uma colônia ou amostra clínica fosse detectada o DNA de *Brucella* spp. na qPCR.

Extração de DNA do tecido, swabs e colônias. Os fragmentos de tecidos com aproximadamente 25 mg foram macerados e uma alíquota de 200 μl foi separada. Os swabs cortados e a alíquota proveniente dos tecidos foram acondicionados em microtubos de 2 ml e adicionado 360 μl de ATL (parte do kit comercial de extração) e 40 μl de proteinase K. As colônias suspeitas isoladas foram colocadas em tubos de 2 ml com 200 μl de solução salina. Todas as amostras foram inativadas a $65^{\circ}\text{C}/1$ hora. Para a extração de DNA dos tecidos e swabs utilizou-se o kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen®, Alemanha) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O gene da Beta actina foi usado para avaliar a qualidade do DNA extraído segundo Bielanski et al. (2009).

PCR em tempo real (qPCR). Para a detecção gênero-específica do DNA de *Brucella* spp. nas colônias, órgãos e swabs foi utilizado o par de primers IS711 que gera um produto de 133 bp (Tabela 1), sendo utilizado segundo Preis et al. (2015). O mix foi composto por 2,9 μl de água livre de nucleases; 12,5 μl 2X QuantiFast Probe RT-PCR Master Mix (Qiagen, Alemanha); 2,5 μl de cada primer (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$); 1,5 μl da sonda (IDT technologies) (5pmol/ μl), 0,6 μl de MgCl_2 (25 mM) e 2,5 μl de DNA

formando com um volume final do mix de 25 µl. Para a termociclagem foram utilizadas no estágio 1 (um), 50°C/2 minutos, estágio 2 (dois) 95°C/15 minutos e 45 ciclos de 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto. As reações foram feitas no termociclador LightCycler® 480 (Roche®).

Nested PCR. A partir do produto em que foi detectado o DNA na qPCR foi feita a Nested-PCR sendo o produto desta sequenciado. A Nested PCR foi feita segundo Preis et al. (2015), gerando fragmentos de 469 bp para a reação externa e 363 bp para a interna. O mix BRU-EX foi composto por 8,7 µl de água livre de nucleases; 4,0 µl de tampão 10X; 1,5 µl do *primer forward* e 2,0 µl do *primer reverse* (10 µmol/ µL); 1,2 µl de MgCl₂ (3mM, 10x PCR Buffer, Invitrogen); 0,4 µl de dNTP (100 mM, Invitrogen); 0,2 µl de Taq (3 UI, Invitrogen) e 2,0 µl de DNA, formando um volume final do mix de 20 µl. O mix BRU-IN foi composto por 8,7 µl de água livre de nucleases; 4,0 µl de tampão 10X; 1,5 µl do *primer forward* e 2,0 µl do *primer reverse* (10 µmol/ µL); 1,2 µl de MgCl₂ (3mM, 10x PCR Buffer, Invitrogen); 0,4 µl de dNTP (100 mM, Invitrogen); 0,2 µl de Taq (3 UI, Invitrogen) e 2,0 µl de DNA, formando um volume final do mix de 20 µl. Para a termociclagem foi utilizado 95°C/5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C/40 segundos, 58°C/40 segundos e 72°C/40 segundos, seguido pela extensão final de 72°C/4 minutos. As reações foram feitas no termociclador Pro flex® 3x32 well PCR System.

Tabela 1 – Sequencia dos *primers* utilizados na qPCR IS711 e Nested PCR para detecção do DNA de *Brucella* spp.

Primers		Sequência
Foward Bru.IS711.133	qPCR IS711	GCCCTTAAGTGATCGGCATC
Reverse Bru.IS711.133	qPCR IS711	GCCTACCGCTGCGAATAAAG
Sonda Bru.IS711.133.S: FAM	qPCR IS711	TGCCCCACACCCTTCAAGCC-BHQ1
Bru1ExF	Nested PCR	CTCAACCATTTTGCCATC
Bru1ExR	Nested PCR	CTGTCCATCAGGCTTTGCT
Bru21nF	Nested PCR	GCCGCTATTATGTGGACTGG
Bru2InR	Nested PCR	GATCGTAGTCGTCCGGGTTA

Eletroforese. Os produtos amplificados na Nested PCR foram analisados por meio da eletroforese em gel por capilares da QIAxcel® advanced system. Utilizando o kit de alta resolução QIAxcel DNA® (QIAGEN, Alemanha). Um volume de 0,1µl do produto de PCR foi injetado automaticamente no cartucho de análise QIAxcel. A separação dos amplicons da eletroforese foi realizada por meio do programa OM500. Para a análise dos dados e geração de uma imagem virtual do gel a biocalculadora QIAxcel foi usada.

Sequenciamento e alinhamento. Os produtos da Nested PCR foram purificados a partir do gel utilizando o kit de extração de DNA *Axyprep* (Axygen Biosciences, EUA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o kit *Big Dye Terminator 3.1* (Applied Biosystems®). Os produtos da reação foram analisados no aparelho Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems, EUA). As sequencias obtidas foram alinhadas usando o programa BioEdit 7.2.5, e a identidade foi analisada comparando com as sequencias existentes no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

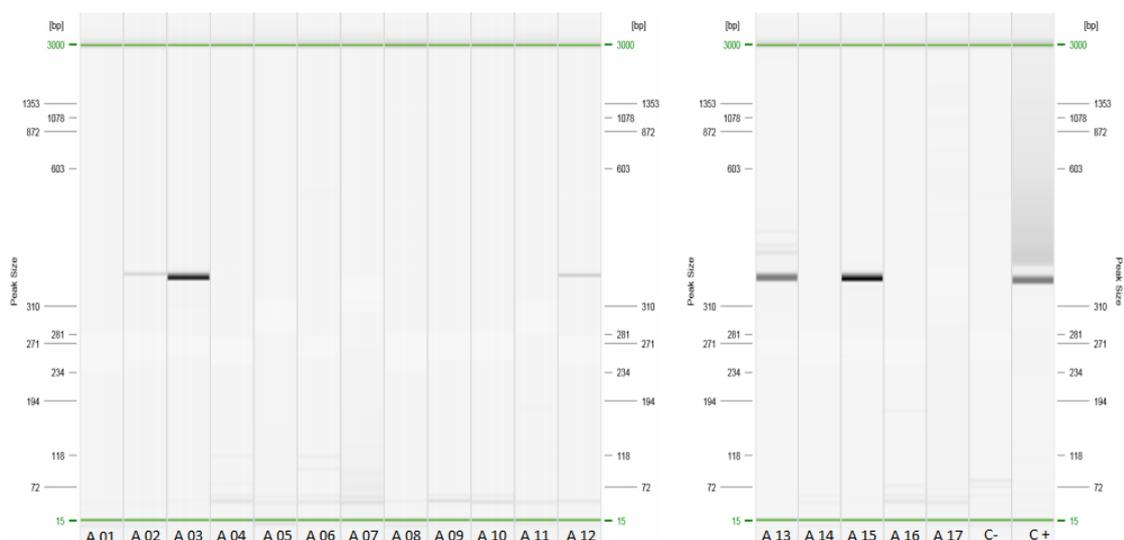
RESULTADOS

Em oito de um total de 52 animais foi obtido o isolamento característico de *Brucella* spp. Em dois porcos ferai foram obtidas duas colônias em cada um totalizando, assim, dez isolados. Em todas estas culturas foram detectados o DNA do gênero *Brucella*, por meio da qPCR, utilizando o *primer* IS711. As amostras clínicas, das quais foram obtidas as colônias isoladas, são constituídas principalmente de swab vaginal e swab nasal, e incluem amostras de tecido, como: baço, linfonodo cervical superficial, ovário e rim.

Do produto adquirido na qPCR, proveniente da colônia obtida de um swab nasal do animal 36, foi feita a Nested PCR (Figura 2) e o produto desta foi purificado e sequenciado. A amostra de DNA da colônia sequenciada obteve uma concordância de 100% com a sequência do gênero *Brucella* por meio da análise no BLAST.

A detecção do DNA de *Brucella* spp., por meio da qPCR, foi feita em todas as amostras clínicas, sendo obtidas amostras positivas em 15 porcos ferai. As amostras em que foi detectado o DNA são provenientes de tecidos, swab anal, swab vaginal, swab nasal e punção aspirativa por agulha fina (Tabela 3).

Figura 2 – Eletroforese em gel por capilares demonstrando os produtos da Nested PCR*.



*C-=Controle negativo; C+=Controle positivo; A03- Amostra 36.

Tabela 3. Amostras em que foi detectado o DNA de *Brucella* spp., diretamente dos tecidos e swabs de porcos ferais, Corumbá, Mato Grosso do Sul.

Animal	Amostra clínica	Procedência
SSRS 008	PAAF Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 023	PAAF Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 024	PAAF Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 042	Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 049	PAAF Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 056	Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 071	Baço	Tecido
SSRS 071	Fígado	Tecido
SSRS 075	Baço	Tecido
SSRS 117	PAAF Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 201	Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 207	Baço	Tecido

SSRS 305	PAAF Linfonodo cervical superficial	Tecido
SSRS 408	Pulmão	Tecido
SSRS 009	Swab nasal	Swab
SSRS 051	Swab nasal	Swab
SSRS 307	Swab vaginal	Swab

*PAAF – Punção aspirativa de agulha fina.

DISCUSSÃO

O isolamento de *Brucella* spp. e a sua confirmação por técnicas moleculares é o primeiro a ser feito em porcos ferais no Brasil. Outros estudos foram feitos em outros países visando o isolamento e caracterização para fins epidemiológicos em porcos ferais (Musser et al., 2013; Pedersen et al., 2014; Rónai et al., 2015). De acordo com os resultados pode-se suspeitar que os porcos ferais são um potencial reservatório de *Brucella* spp., assim como ocorre em populações de porcos ferais em outros países (Stoffregen et al., 2007; Grégoire et al., 2012; Kreizinger et al., 2014).

Foram obtidos isolados provenientes da vagina, anus e região nasal dos animais e diretamente dos tecidos, como o baço, rim, linfonodo cervical superficial e ovário. Stoffregen et al. (2007) também obtiveram isolados provenientes de swab nasal e vaginal, baço, rim e linfonodo como o presente trabalho, porem o swab anal e ovário não foram descritos pelos mesmos autores.

A área deste estudo compreendeu uma localidade que apresentou todos os isolados deste estudo, contendo cinco fazendas de modo que fatores como localidade podem influenciar na presença de porcos ferais com *Brucella* spp. Além da localidade, fatores comportamentais observados podem influenciar na dinâmica do agente e os porcos ferais, como o de se alimentarem de carcaças de gado, predação de bezerros e filhotes de ovelhas recém-nascidos, ingestão de vegetação e raízes no ato de roçarem a terra e o consumo da mesma aguada e ração dos bovinos (Desbiez et al., 2009; Desbiez et al., 2010).

A demonstração da presença de isolados na região vaginal demonstra uma possível eliminação do agente por esta via, bem como a possível excreção do agente por meio da urina devido ao isolamento no rim. Possivelmente os porcos ferais são hospedeiros e podem estar agindo como reservatórios como descrito em outros países (Cvetnic et al., 2009; Leiser et al., 2013).

Foi detectado o DNA de *Brucella* spp. em 15 animais com a utilização de diferentes amostras clínicas, porem damos destaque para a utilização da PAAF, em animais não necropsiados, que foi responsável por auxiliar na obtenção das amostras do total de 35% das amostras com o DNA de *Brucella* spp. A detecção do DNA foi maior nos linfonodos. Stoffregen et al. (2007) obtiveram a maioria dos isolados (61,3%) em linfonodos, demonstrando assim a importância destes como um alvo para isolamento e detecção do DNA de *Brucella* spp.

Devido ao estreito convívio com os bovinos e outros animais silvestres no ambiente do Pantanal, possivelmente outras espécies, como cervídeos e espécies domésticas como os bovinos e suínos criados extensivamente próximo as sedes das fazendas possam participar da cadeia epidemiológica de *Brucella* spp. Já que suínos menos frequentemente podem se tornar infectados por *B. abortus* em áreas onde a brucelose é enzoótica nos ruminantes (EFSA, 2009). Os porcos ferais também podem manter e eliminar a *B. abortus* e a *B. suis* podendo contaminar o ambiente onde vivem, sendo uma potencial fonte de infecção para os bovinos. Stoffregen et al. (2007) descreveram a infecção bem estabelecida por *B. abortus* e *B. suis* em uma população de suínos ferais nos Estados Unidos onde havia a presença de bovinos e Stuart et al. (1987) demonstrou que suínos infectados experimentalmente eliminam a *B. abortus*.

Até o momento não se chegou à espécie e biovar dos isolados, essa informação é muito importante para elucidar a real relação epidemiológica do agente nos porcos ferais e nas espécies domésticas e silvestres que vivem na mesma área destes suídeos. A presença de *Brucella* spp. pode pertencer a *Brucella suis* ou a *Brucella abortus* de acordo com relatos da literatura em porcos ferais (Stoffregen et al., 2007; Meng et al., 2009).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados este é o primeiro isolamento e confirmação de *Brucella* spp. em porcos ferais de vida livre no Brasil. Há a presença de *Brucella* spp. nos porcos ferais na região do Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul e estes animais podem estar atuando como reservatório de *Brucella* spp.

REFERÊNCIAS

- Alho C.J.R., Mamede S., Bitencourt K., Benites M. 2011. Introduced species in the Pantanal: implications for conservation. *Brazilian Journal of Biology*. 71(1):321-325.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- BRASIL. 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). 188 p.
- Bielanski A., Algire J., Lalonde A. 2009. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*. 71 (3), 499-508.
- Deberdt A. J., Scherer S. B. 2007. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. *Natureza e Conservação*, 5(2):31 – 44.
- Desbiez A.L.J., Keuroghlian A., Piovezan U., Bodmer R. E. 2009. Ecologia de populações de porco monteiro no Pantanal do Brasil. Documento n° 106. Embrapa Pantanal, Corumbá, Brazil.
- Desbiez A.L.J., Keuroghlian a., Piovezan u., Bodmer R.E. 2010. Invasive species and bushmeat hunting contributing to wildlife conservation: the case of feral pigs in a Neotropical wetland. *Fauna & Flora International*, Oryx. 45(1):78-83.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2009. Porcine brucellosis (*Brucella suis*)1 Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. *The EFSA Journal*. 1114:1-112.
- Gisd. 2007. Global Invasive Species Database. Disponível em: <http://www.issg.org/database/species>; acessado em: 03/11/2015.
- Godfroid J., Garin-Bastuji B., Saegerman C., Blasco J.M. 2013. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 32(1):27-42.
- Grégoire F., Mousset B., Hanrez D., Michaux C., Walravens K., Linden A. 2012. A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *Veterinary Research*.80:1-8.
- Leiser O.P., Corn J.L., Schmit B.S., Keim P.S., Foster T.F. 2013. Feral swine brucellosis in the United States and prospective genomic techniques for disease epidemiology. *Veterinary Microbiology* 166:1-10.
- LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário. 2015. Técnicas moleculares. Dados não publicados.
- Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *The Royal Society*. 364:2697-2707.
- Motta P.M.C., Fonseca Jr. A.A., De Oliveira A.M., Nascimento K. F., Soares Filho P.M., Serra C.V. et al. 2010. Inquérito soropidemiológico para brucelose em suínos do Brasil. *Veterinária em Foco*. 7(2):141-147.
- Mourão G., Coutinho M., Mauro R., Tomás W., 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*. 28:1-22.
- Kreizinger., Foster J.T., Rónai Z., Sulyok K.M., Wehmann E., Jánosi S., Gyuranecz M. 2014. Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. *Veterinary Microbiology*. 172:492-498.
- Pedersen K., Quance C.R., Robbe-Austerman S., Piaggio A.J., Bevins S.N., Goldstein S.M., Gaston W.D., DeLiberto T.J. 2013. Identification of *Brucella suis* from feral swine in selected states in the USA. *Journal of Wildlife Diseases*. 50(2):171-179.
- Pedrosa F., Salerno R., Padilha F.V.B., Galetti M. 2015. Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. *Natureza & Conservação*. 13(1):84-87.

- Preis, I.S., De Souza, N.M., De Souza, P.G., Faria, G.C., Filho, P.M.S., Júnior, A.A.F. Validation three real time PCR and Nested PCR for diagnosis of brucellosis in cattle. 2016. Trabalho desenvolvido no Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO. Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2016.
- Ronái Z., Kreizinger Z., Dán Á., Drees K., Foster J.T., Bányai K, Marton S., Szeredi L, Jánosi S., Gyuranecz M. 2015. First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. BMC Veterinary Research. 11:1-6.
- Seward N.W., VerCauteren K.C., Witmer G.W., Engeman R.M. 2004. Feral swine impacts on agriculture and the environment. Sheep & Goat Research Journal.19:34-40.
- Stoffregen W.C., Olsen S.C., Wheeler C.J., Bricker B.J., Palmer M.V., Jensen A.E., Halling S.M., Alt D.P. 2007. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 19:227-237.
- Stuart F.A., Corbel M.J., Brewer R.A. 1987. Experimental *Brucella abortus* Infection in Pigs. Veterinary Microbiology. 14:365-379.
- Zimmermann, N.P. Uso da associação de cloridrato de xilazina, cloridrato de ketamina e cloridrato de midazolam para a contenção química de porcos-ferais. Dados não publicados.