

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

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA BRUCELOSE EM  
MAMÍFEROS SILVESTRES SIMPÁTRICOS AOS  
BOVINOS NO PANTANAL**

**Igor Alexandre Hany Fuzeta Schabib Péres**

**CAMPO GRANDE, MS**

**2016**

*Lombada*

SCHABIB PÉRES		ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA BRUCELOSE EM MAMÍFEROS SILVESTRES SIMPÁTRICOS AOS BOVINOS NO PANTANAL		2016
---------------	--	---	--	------

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

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA BRUCELOSE EM MAMÍFEROS  
SILVESTRES SIMPÁTRICOS AOS BOVINOS NO PANTANAL**

**EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF BRUCELLOSIS IN WILD  
MAMMALS SYMPATRIC TO CATTLE ON PANTANAL**

**Igor Alexandre Hany Fuzeta Schabib Péres**

**Orientador: Profa. Dra. 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 de concentração: Saúde Animal

## **Dedicatória**

*À minha amada companheira Nanda*

*Aos meus pais: Waded e Ney*

*Aos meus irmãos: Luana, Neder e Pedro*

*Aos animais: da cidade, dos campos e do mato.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fernanda Lopez Athas (*Nanda*), companheira sem limites, de compreensão sem fim, por todo o apoio dado a uma etapa única das nossas vidas. Inclusive o apoio na própria tese, desde o planejamento dos trabalhos até a execução das pesadas tarefas no Pantanal.

A minha querida família: Waded, Ney, Luana, Neder e Pedro, que me fazem a cada dia enxergar que as melhores pessoas do mundo caminham ao nosso lado.

As minhas “segundas” várias famílias: tias, tios e avó que em Corumbá, mais do que acolher a um parente, me ajudaram a montar uma base de operações de campo, da qual boa parte da tese dependeu diretamente.

A orientadora, colega e grande amiga Aiesca Oliveira Pellegrin que sempre esteve disposta para de fato, orientar, direcionando os esforços em uma pesquisa desafiadora, sem perder o foco.

A Dr<sup>a</sup> Raquel Juliano, que contribuiu muito para que a logística de toda a equipe envolvida no trabalho fosse possível, sempre com bom humor e leveza.

Ao Namor Zimmermann, amigo de longa data, que se dedicou muito à todas as etapas da nossa pesquisa. Contribuindo no desenvolvimento das técnicas de campo e laboratório que fazem parte dessa tese. Hoje se tornou um dos maiores especialistas em porcos selvagens do Brasil.

As pesquisadoras Alda Izabel, Ana Luiza Osório e Grácia Rosinha, que desde o início do minha empreitada na pós-graduação contribuem, sedem laboratórios e revisam minha produção científica, em diferentes áreas de atuação.

A todos os pesquisadores convidados para dar a sua contribuição na tese, tornando-a mais abrangente em áreas multidisciplinares do conhecimento.

Aos veterinários que participaram ativamente das equipes de campo: Namor, Paulo, Gislaine, Diego, Lorena, Thamy. Contribuindo para dar a melhor condição clínica possível aos nossos “pacientes forçados”.

Aos colegas da Nhumirim que nos ensinaram muito e nos deram a oportunidade de contribuir com as suas pesquisas: Walfrido, Guilherme, Zucco, Alessandro, Gisele, Grazielle, Laísa, Nina, George, Gabriel, André, Carol, Wendy, Guelety.

À todos os funcionários da Embrapa Pantanal pela participação neste trabalho em algum momento. Em especial a: Antônio Arantes, Armindo, Batista, Ricardo, Cleomar, Ana Cláudia, Oziel, Dênis, Wibert, João Batista, Beto Pellegrin, Aquino, Ted, Haroldo, Airton, Nelson, Roberto, Zairo, José Augusto, Marcílio, Reginaldo, Wandir, Marcos Tadeu, Hildeberto, Moacir, estendido ao Ireido.

Aos proprietários e aos seus funcionários rurais do Pantanal que compreenderam a importância do estudo e colaboraram diretamente com a pesquisa, cedendo infraestrutura e animais que fizeram com que este trabalho tivesse uma cobertura amostral mais representativa dos animais silvestres do Pantanal.

Aos amigos que nos receberam em cidades distantes: Marcos, Geiza, William, Cahuê, Jacy, Álvaro. Tornando possível a realização dos diagnósticos que integraram essa tese.

A equipe do Laboratório Nacional Agropecuário: Pedro Mota, Paulo Martins, Patrícia Souza, Antônio Fonseca, Ana Cláudia Cotorello, Lívia Orzil, Matheus, Ana Paula, Gracyelle. Pelo apoio no diagnóstico microbiológico e molecular da brucelose.

A toda a equipe da Medicina Veterinária Preventiva da Unesp Jaboticabal, em nome do Prof<sup>o</sup> Luís Antonio Mathias, que colaborou com o diagnóstico da brucelose pela FPA.

Ao Prof<sup>o</sup> Fernando Ferreira e sua equipe da Medicina Veterinária Preventiva da USP, pelo suporte nas análises e interpretação dos dados estatísticos.

*A ciência pode classificar e nomear os órgãos de um sabiá mas não pode medir seus encantos.*

*A ciência não pode calcular quantos cavalos de força existem nos encantos de um sabiá.*

*Quem acumula muita informação perde o condão de adivinhar: divinare.*

*Os sabiás divinam.*

***Manoel de Barros*** (poeta pantaneiro)

## Resumo

IGOR ALEXANDRE HANY FUZETA SCHABIB PÉRES. Aspectos Epidemiológicos da Brucelose em Mamíferos Silvestres Simpátricos aos Bovinos no Pantanal. 2016. 70 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

A brucelose não é apenas uma doença que afeta o homem, animais domésticos e silvestres, ela também regula e é regulada pelas interações que ocorrem entre esses seres, assim como pelo ambiente em que está inserida e por suas características intrínsecas. O conhecimento e o monitoramento das infecções causadas por *Brucella* spp. em mamíferos de vida livre é estratégico para os programas de controle e erradicação da brucelose animal. O objetivo geral deste estudo foi contribuir para a compreensão da dinâmica epidemiológica da brucelose no Pantanal, especialmente, nas áreas onde bovinos e animais silvestres vivem em simpatria. No primeiro artigo o veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) foi selecionado como sentinela epidemiológica, por sua ampla distribuição na região e características taxonômicas e biológicas semelhantes às do gado. Foi feito o levantamento da soroprevalência para brucelose, encontrando 6,59% dos indivíduos positivos e uma análise de fatores de risco que identificou associação entre a inundação do Pantanal e a ocorrência de cervídeos positivos para a doença. No segundo trabalho, foram coletadas diferentes amostras biológicas de veado-campeiro (*O. bezoarticus*), lobinho (*Cerdocyon thous*) e quati (*Nasua nasua*), com objetivo de avaliar a exposição destes animais à brucelose e detectar o DNA de *Brucella* spp., de forma que fosse possível identificar a espécie da bactéria presente na região. Foi possível confirmar a presença de anticorpos contra *Brucella* spp. nas provas indiretas (sorológicas), e detectar o DNA desta bactéria nas amostras, por meio de técnicas moleculares de diagnóstico. Dentre as amostras positivas, foi feito o sequenciamento dos fragmentos genéticos amplificados, sendo descartada a possibilidade de infecção vacinal por *Brucella abortus* biovar 1 B19. Foi possível detectar e identificar *Brucella abortus* presente em um aspirado de linfonodo de quati.

Palavras-chave: *Brucella* spp.; diagnóstico, *Cerdocyon thous*; *Nasua nasua*; *Ozotoceros bezoarticus*.

# EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF BRUCELLOSIS IN WILD MAMMALS SYMPATRIC TO CATTLE ON PANTANAL

## Abstract

IGOR ALEXANDRE HANY FUZETA SCHABIB PÉRES. Epidemiological aspects of brucellosis in wild mammals sympatric to cattle on Pantanal. 2016. 70 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Brucellosis is not just a disease that affects humans, domestic and wild animals, it also regulates and is regulated by the interespecific interactions that occur in these species even as by the environment in which it operates and its intrinsic characteristics. The knowledge and monitoring of infections caused by *Brucella* spp. in free-living mammals is strategic for the control and eradication of animal brucellosis programs. The aim of this study was to understanding the brucellosis epidemiology in the Pantanal, especially in areas where wild animals live in sympatric relationship with cattle. In the first article of this thesis, the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) was selected as an epidemiological sentinel, because its wide distribution in the region and taxonomic and biological characteristics similar to those of cattle. A survey for seroprevalence of brucellosis was executed, finding 6.59% of positive individuals. An analysis of risk factors identified association between flooding of the Pantanal and the occurrence of positive deer for brucellosis. In the second study, were collected different biological samples of pampas deer (*O. bezoarticus*), eating-crab fox (*Cerdocyons thous*) and red-nosed coati (*Nasua nasua*), to evaluate the exposure of these animals to brucellosis and detect DNA of *Brucella* spp. Therefore, it was possible to identify the species of bacteria present in the wetland. *Brucella* spp. was found by serological test, which detect antibodies against the bacterium. DNA of *Brucella* spp. was detected among examined samples. From the ADN-positive samples, the sequencing of fragments was performed, and rejected the possibility of vaccinal infection by *Brucella abortus* biovar 1 S19. *Brucella abortus* has been detected and identified in a coati lymph node aspirate.

Keywords: *Brucella* spp.; diagnosis; *Cerdocyon thous*; *Nasua nasua*; *Ozotoceros bezoarticus*;

**Lista de abreviaturas e siglas (Opcional)**

2-ME	2-mercaptoetanol
AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
dNTP	Desoxinucleotídeos (A, T, C, G)
FC	Fixação do Complemento
FPA	<i>Fluorescent Polarization Assay</i> – Prova da polarização Fluorescente
IC	Intervalo de confiança
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LPS	Lipopolissacarídeo
mP	Milipolarização (unidade de medida da FPA)
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PCR <i>Multiplex</i>	PCR com vários pares de nucleotídeos que tem como alvo diferentes partes do DNA examinado
PCR AMOS	Um tipo de PCR <i>Multiplex</i> , no caso com nucleotídeos tendo como alvo: <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. ovis</i> e <i>B. suis</i> .
PCR <i>nested</i>	PCR realizada em série, onde o produto da primeira reação é o alvo da segunda PCR, a intenção é aumentar a especificidade da técnica
PCR real-time ou qPCR	PCR quantitativa, onde a interpretação dos resultados é feita com auxílio de um aparelho. Este mede a quantidade de luminescência emitida pelo segmento de DNA amplificado, em cada ciclo da reação, até que a emissão da luz ultrapasse um ponto de corte.
pb	Pares de bases nitrogenadas (unidade de medida do tamanho dos fragmentos genéticos)
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
Taq	Enzima polimerase que possui atividade ótima próximas a 90°C, necessária para a amplificação do DNA na PCR. Teve seu nome derivado da bactéria <i>Thermophilus aquiferus</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias (unidade de medida)

## SUMÁRIO

### SUMÁRIO

1.1	<i>Brucella</i> spp. ....	12
1.1.1	Microbiologia .....	12
1.1.2	Relação entre <i>Brucella</i> spp. e hospedeiros .....	13
1.2	Brucelose .....	14
1.2.1	Ocorrência .....	14
1.2.2	Hospedeiros .....	15
1.2.3	Transmissão .....	15
1.2.4	Fisiopatogenia, sinais clínicos e alterações patológicas .....	16
1.2.5	Interações entre patógeno, hospedeiros e ambiente.....	18
1.2.6	Programas sanitários.....	20
	LITERATURA CONSULTADA .....	23
	ARTIGO 1. – Formato: Pesquisa Veterinária Brasileira.....	29
	Fatores de risco e soroprevalência da brucelose em veado-campeiro ( <i>Ozotoceros bezoarticus</i> ) em contato com bovinos no Pantanal Sul-mato-grossense.....	29
	ABSTRACT .....	29
	RESUMO .....	30
	INTRODUÇÃO.....	30
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
	RESULTADOS .....	34
	DISCUSSÃO .....	38
	LITERATURA CITADA .....	42
	ARTIGO 2. – Formato: Pesquisa Veterinária Brasileira.....	45
	Deteção de <i>Brucella</i> spp. em mamíferos silvestres sorologicamente positivos no Pantanal sul-mato-grossense .....	45
	ABSTRACT .....	45
	RESUMO .....	46
	INTRODUÇÃO.....	46
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
	RESULTADOS .....	53
	DISCUSSÃO .....	56
	LITERATURA CITADA .....	61
	APÊNDICES .....	65

## INTRODUÇÃO

O capítulo introdutório da presente tese apresenta uma breve atualização sobre *Brucella* spp., além de uma revisão de literatura que compara os aspectos epidemiológicos da brucelose em animais silvestres com os descritos para animais domésticos. São discutidos ainda os programas de controle para esta doença no mundo.

Foram incluídos alguns exemplos de programas de vigilância específicos para o monitoramento da brucelose em animais silvestres. Fatores ambientais que podem interferir na cadeia epidemiológica da brucelose foram abordados e discutidos, dentro da realidade pantaneira, analisando as situações e condições que poderiam afetar a distribuição da enfermidade neste ambiente.

### 1.1 *Brucella* spp.

#### 1.1.1 Microbiologia

As bactérias causadoras da brucelose são cocobacilos Gram negativos, intracelulares facultativos, aeróbios, que se desenvolvem melhor em atmosferas com concentração de oxigênio controlada, entre (5 e 10%) (ALTON et al., 1988). Não possuem cápsula, estruturas de locomoção e não esporulam. Embora a maioria das espécies de *Brucella* possuam 2 cromossomos circulares, *B. suis* biovar 3 tem apenas um cromossomo. Os nucleotídeos G ou C constituem 57 % do DNA de *Brucella* spp. (BOSCHIROLI et al, 2001; QUINN et al., 2005).

Após 72 horas em condições de cultivo apropriadas as colônias de *Brucella* spp. podem ser visualizadas. Porém, só aproximadamente no 12º dia é possível avaliar o aspecto macroscópico destas, que podem ser lisas devido a presença da cadeia lateral “O” no lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, ou rugosas (sem a cadeia lateral “O” no LPS). As colônias lisas, características de *B. abortus*, *B. mellitensis*, *B. suis* e *B. neotomae* são esbranquiçadas, convexas e de consistência cremosa. Já as colônias rugosas podem ser dos tipos estrita (característica de *B. ovis*): seca, amarelo-opaca e friável, ou mucóide (aspecto de *B. canis*): semelhante à estrita, porém com textura viscosa. As colônias lisas, após sucessivas replicações laboratoriais ou com o passar do tempo no meio de isolamento podem se tornar rugosas. (WALKER, 2003; QUINN et al., 2005; MONTEIRO, 2006).

As variações fenotípicas nas colônias de diferentes espécies de *Brucella* estão associadas a adaptações naturais desta bactéria aos seus reservatórios e, no caso de *B. abortus*,

*B. mellitensis* e *B. suis* estão relacionadas a características de virulência e patogenicidade (JIMÉNEZ DE BAGÜÉS et al., 2004, XAVIER et al., 2010).

*Brucella* spp. pode sobreviver por até quatro meses na água ou solo úmido em condições de temperatura e umidade favoráveis, ou por até oito meses no interior de material biológico como leite, placenta, feto abortado, urina e fezes (WALKER, 2003; BRASIL, 2006). Essa resistência ambiental é um dos maiores desafios para países que erradicaram o agente dos rebanhos domésticos. A persistência da bactéria no solo, vegetação e restos de animais abortados ou carcaças favorece sua disseminação (AUNE et al., 2011).

Do ponto de vista zoonótico, os métodos de pasteurização de produtos lácteos e derivados e o uso de desinfetantes a base de cloro, formaldeído ou o álcool 70° são eficientes para eliminar a bactéria, desde que utilizados nas concentrações recomendadas (OMS, 1986; PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

### 1.1.2 Relação entre *Brucella* spp. e hospedeiros

Originariamente, as seis espécies de *Brucella* conhecidas como clássicas, *B. mellitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis* e *B. neotomae* (EISEMBERG et al., 2012), eram relacionadas a uma única genoespécie, a *B. mellitensis* (VERGER et al. 1985). Isso começou a mudar a partir do isolamento de *Brucella* spp. em mamíferos marinhos (EWALT et al., 1994). Em seguida, com os avanços nas tecnologias de pesquisa em biologia molecular, a monoespecificidade do gênero foi contestada (MORENO et al., 2002).

Recentemente, foram identificadas várias novas espécies de *Brucella*, sobretudo em animais silvestres, como por exemplo a descrita por Tiller et al., (2010), que foi caracterizada geneticamente a partir de sete isolados de diferentes espécies de roedores australianos coletados em 1964, quando ainda não haviam recursos tecnológicos para a descoberta.

Uma nova espécie de *Brucella* foi associada a anfíbios criados em cativeiro na Alemanha, sendo isolada a partir de abscessos de pele em pererecas africanas (*Leptopelis vermiculatus*) (FISCHER et al., 2012) e de órgãos internos de rã-touro-africana (*Pyxicephalus edulis*) (EISEMBERG et al., 2012). Mais tarde, no Reino Unido, colônias genotipicamente semelhantes as bactérias descritas acima também foram isoladas de lesões de pele em perereca-verde-australiana (*Litoria caerulea*) (WHATMORE et al., 2015). A identificação desta *Brucella* sp. em anfíbios abre novas perspectivas, já que até então, todas as espécies de referência da bactéria estavam associadas a mamíferos.

*Brucella papionis* é a mais nova representante do gênero identificada até o momento. Foi isolada e genotipada a partir de suabes da cérvix uterina de babuínos (*Papio* spp.), que apresentavam histórico e sintomatologia clínica característicos de doença reprodutiva (WHATMORE et al., 2014).

Portanto, ao menos 13 espécies de *Brucella* spp. são conhecidas: *B. abortus* (biotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9), *B. mellitensis* (biotipos 1, 2, 3), *B. suis* (biotipos 1, 2, 3, 4, 5), *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti* e *B. inopinata* (WHATMORE, 2009; MAYER-SCHOLL et al., 2010), *Brucella* sp. dos roedores australianos (TILLER et al., 2010), *Brucella* sp. de anuros (EISENBERG et al., 2012; FISHER et al., 2012; WHATMORE et al., 2015) e *Brucella papionis* (WHATMORE et al., 2014). O estudo taxonômico em conjunto com a microbiologia das bactérias é importante para avaliar a coevolução e coadaptação do patógeno ao seu hospedeiro natural e ao ecossistema à que este está integrado. Com tais informações, é possível evidenciar aspectos genéticos, ecológicos, patogênicos e fisiológicos, importantes para *Brucella* spp., e planejar melhor medidas de controle sanitário.

## **1.2 Brucelose**

### **1.2.1 Ocorrência**

Afetando humanos, animais domésticos e silvestres, a ocorrência da brucelose está sempre associada à presença da *Brucella* spp. em hospedeiros reservatórios e no ambiente (GODFROID, 2002). Devido a esse caráter infectante multiespecífico, países como Espanha, EUA e Canadá, que obtiveram sucesso na eliminação e redução da brucelose dos rebanhos domésticos, têm combatido a doença em áreas restritas, geralmente, relacionadas com Parques Nacionais. Nestes locais, ungulados silvestres mantêm as taxas de infecção por *Brucella* spp. eliminando a bactéria no ambiente (SERRANO et al., 2011; CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998; USDA, 2003).

Grandes investimentos e esforços têm sido implementados em diferentes regiões do mundo para reduzir as prevalências da brucelose animal (PECK, 2010, McDERMOTT et al., 2013; SANTOS et al., 2013). Essa doença é de difícil controle mesmo em locais onde já foi erradicada dos rebanhos comerciais e tem ressurgido a partir da manutenção da bactéria por reservatórios silvestres infectados (HIGGINS et al., 2012). Ainda, a brucelose pode constituir uma barreira sanitária e até mesmo arma biológica (DOGANAY & DOGANAY, 2013).

Os estudos realizados em animais silvestres no Brasil indicam, em sua maioria, apenas exposição à *Brucella* spp. Na região pantaneira, foram executados levantamentos sorológicos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e queixadas (*Tayassu pecari*) (ITO et al., 1998); em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) (MATHIAS et al., 1999; ELISEI, et al., 2010, SCHABIB-PÉRES, 2010); em porcos-monteiros (*Sus scrofa*) (PAES et al. 2008); lobinhos (*Cerdocyon thous*) e quatis (*Nasua nasua*) (DORNELES, et al. 2014).

### 1.2.2 Hospedeiros

Em ambientes, como o Pantanal, onde ocorrem altas taxas de contato entre a fauna e rebanhos domésticos, o monitoramento epidemiológico deve ser direcionado para as doenças que possam sofrer o processo de *spillover* ou “transbordamento interespecífico”, afetando hospedeiros acidentais (DASZAK et al., 2000; BENGIS, 2002).

Para verificar se um animal silvestre constitui um reservatório e fonte de infecção de *Brucella* spp., é necessário identificar se a doença só se estabelece quando há o contato com animais de produção (*spillover*), ou se ela ocorre no ambiente e nos hospedeiros silvestres mesmo na ausência dos rebanhos domésticos. Se a situação encontrada for o segundo caso, o monitoramento das populações silvestres torna-se prioritário, sob o risco de re-introdução (*spill back*) da doença nos rebanhos domésticos (GODFROID, 2002).

Um cenário de *spill back* pode ser a causa do problema sanitário que ocorre nas populações de cervídeos e bisões da região do Parque do Yellowstone, nos EUA. Nesta área, o gado bovino com altas taxas de brucelose foi introduzido no início do século passado, podendo ter causado *spillover* da doença para o ambiente selvagem (CHEVILLE, 1998). Atualmente, aqueles ruminantes silvestres que foram infectados pelo gado, mantém *Brucella* spp. no ambiente, causando surtos da doença (GODFROID et al., 2014).

### 1.2.3 Transmissão

Tanto para bovinos, como para os animais silvestres, as fêmeas gestantes infectadas são a principal fonte de contaminação ambiental. Estas, ao abortar ou parir, eliminam grandes quantidades de *Brucella* spp. no ambiente, contaminando pastagens, água e solo (OMS, 1986; CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998; BRASIL, 2006). Uma vaca que aborta por brucelose pode permanecer por até 30 dias eliminando o patógeno no ambiente (BRASIL, 2006).

Nos ruminantes domésticos e silvestres a principal forma de infecção por *Brucella* spp. é a via digestiva (WITTER, 1981; UHART et al., 2010), pela ingestão de água ou de pastagens

contaminadas. Os bovinos possuem outras importantes vias de infecção, como a aerógena e o contato direto de *Brucella* spp. com as mucosas conjuntivas (BRASIL, 2006; PAULIN, 2003).

*B. abortus* pode infectar animais silvestres pelo contato direto com as mucosas nasofaríngea, oral, conjuntival e vaginal e também por via intrauterina (DAVIS et al., 1988; USDA, 2008; GODFROID et al., 2013). Para *B. ovis* a via de infecção venérea é a mais importante, essencialmente para os cervídeos machos, onde esta bactéria encontra seus locais de predileção (testículos e epidídimo) para instalação (MACKINTOSH et al., 2002). Nos bovinos, a vagina possui defesas naturais eficientes para eliminar a *Brucella* spp. em situação de monta natural, mas, na inseminação artificial existe risco de infecção, já que o sêmen é depositado na cérvice uterina (LAGE, 2008).

Os carnívoros se infectam com *B. abortus* principalmente pela via digestiva, quando se alimentam de tecidos contaminados como fetos abortados e carcaças de animais ou presas infectadas (MEGID et al., 2007; MAICHAK et al., 2009; USDA, 2012). No entanto, em condições normais, atuam como hospedeiros terminais para *B. abortus*, uma vez que eliminam concentrações muito baixas desta bactéria no ambiente, insuficientes para estabelecer a infecção nos hospedeiros susceptíveis (DAVIS et al., 1988; TESSARO & FORBES, 2004; MEGID et al., 2007).

#### **1.2.4 Fisiopatogenia, sinais clínicos e alterações patológicas**

O estabelecimento da brucelose e o seu grau de severidade em animais silvestres são regulados pela espécie de *Brucella* e as diferentes biovars, o estágio da gestação, a quantidade de bactérias no inóculo infectante, a taxa de contato com os reservatórios e as características de susceptibilidade e resistência dos hospedeiros (TESSARO et al., 1990; BEVINS et al., 1996; AL DAHOUK et al., 2005; USDA, 2008; GODFROID et al., 2013).

De modo geral, a patologia da brucelose em animais silvestres se assemelha a dos domésticos (GODFROID et al., 2013). Ao penetrar no organismo do hospedeiro, pelas mucosas ou via digestiva, *Brucella* spp. realizam um curto período de bacteremia, sendo capturadas e transportadas por células fagocitárias até os linfonodos regionais (COSTA, 2001). Ao entrar em contato com receptores dos macrófagos que regulam a fixação e apreensão de bactérias, *Brucella* spp. inibe a fusão com os fagolisossomos intracelulares dos macrófagos, podendo então se multiplicar no retículo endoplasmático rugoso (DELRUE et al., 2004; XAVIER et al., 2010).

Quanto mais avançada é a gestação, maior é a probabilidade de infecção do útero gravídico (BRASIL, 2006). Nos casos agudos ocorre a placentite necrosante, devido à destruição dos placentomas por endotoxinas produzidas por *Brucella* spp. Há o descolamento das vilosidades que unem as carúnculas uterinas aos cotilédones placentários, comprometendo o aporte sanguíneo ao feto, prejudicando a respiração e nutrição e, causando a morte fetal (WALKER, 2003; PAULIN, 2003; ANDERSON, 2007).

Vacas que já abortaram por brucelose podem tornar-se resistentes à doença e transmitir *Brucella* spp. pelo leite ou parir bezerros infectados durante o período intrauterino. Se o bezerro parido for uma fêmea, esta tenderá a abortar nos estágios avançados de sua primeira gestação, apresentando soropositividade tardia (BRASIL, 2006). Nestes casos, *B. abortus* estabelecida nos órgãos ricos em células do sistema reticuloendoleial (mononuclear fagocitário) como o baço, fígado e linfonodos (PAULIN, 2003), migram para os placentomas atraídas pelo aumento da produção do açúcar eritritol (ESSENBERG et al., 2002).

Nos casos crônicos, quando as lesões necrosantes são menores, ocorre maior deposição de fibrina nas vilosidades dos placentomas e maior possibilidade de retenção da placenta num eventual parto ou aborto, pois dificilmente a placenta se descola do útero quando as vilosidades estão cicatrizadas (PAULIN, 2003). Alterações locomotoras e lesões osteoarticulares, como higromas, osteomielite e artrite podem estar presentes em infecções crônicas em animais domésticos (XAVIER et al., 2010) e silvestres (GODFROID et al., 2013).

O feto também pode ser diretamente infectado e morto por endotoxinas de *Brucella* spp. ou o parto prematuro pode ser induzido devido ao estresse fetal resultante da inflamação dos tecidos placentários (ADAMS, 2002; WALKER, 2003). Pneumonia intersticial, alterações sero-hemorrágicas cavitárias e musculares, pleurite e pericardite fibrinosa, meningite, vasculite e conteúdo abomasal anormal podem ocorrer em fetos infectados por *Brucella* spp. (XAVIER et al., 2010; GODFROID et al., 2013)

Ao contrário dos ungulados, o homem, roedores, equinos, e lagomorfos (coelhos) não produzem o eritritol em níveis detectáveis na placenta, testículos, articulações e glândula mamária. Esta particularidade fisiológica pode explicar a menor predileção de *B. abortus* pelos tecidos placentários durante a gestação nestas espécies (RIBEIRO et al., 2008; JAIN et al., 2012). Contudo, existem outros carboidratos como o glicerol e as hexoses produzidos nos órgãos reprodutores que *Brucella* spp. pode utilizar como fonte energética. No processo de obtenção da cepa vacinal *B. abortus* B19 houve mutações (especialmente no gene *ery*) que comprometeram a capacidade de metabolizar carboidratos essenciais para a biossíntese do LPS de membrana, responsável por parte da virulência (ESSENBERG et al., 2002)

Os cervídeos também possuem células trofoblásticas que produzem o eritritol em altas quantidades durante a gestação, atraindo *Brucella* sp. dos linfonodos regionais para o útero. A placenta destes animais é do tipo oligocotiledonária, com no máximo dez placentomas, diferindo dos bovinos, ovinos e caprinos, onde a quantidade destas estruturas costuma ser 10 vezes maior (BENIRSCHKE, 2005). Em comparação com os ruminantes domésticos, a infecção do placentoma cervídeo por *Brucella* spp. pode causar um comprometimento proporcionalmente maior do aporte sanguíneo materno para o feto.

Nos cervídeos pode ocorrer a placentite necrosante, causando o aborto por *Brucella* spp. (MACKINTOSH et al., 2002; GODFROID et al., 2013). Além do útero, ocorre multiplicação bacteriana no úbere das fêmeas (UHART et al., 2010) e nos testículos e epidídimos dos machos, especialmente nas infecções por *B. ovis*, causando inflamações e fibrose (RIDLER, 2001).

Neiland & Miller (1981) observaram abortos e alterações patológicas em cães e lobos (*Canis lupus*) gestantes, infectados experimentalmente com *B. suis* biovar tipo 4. Porém, Tessaro & Forbes (2004) não encontraram sinais clínicos, laboratoriais ou lesões macroscópicas e histopatológicas em lobos machos infectados por *B. abortus* biovar 1. Coiotes (*Canis latrans*) só eliminaram a bactéria em quantidades suficientes para causar o aborto em bovinos, quando foram infectados com concentrações de *B. abortus* 2308 acima das encontradas na natureza (DAVIS et al., 1988).

Em cães a infecção por *B. abortus* com manifestações clínicas é ocasional e relacionada à ingestão de produtos ou tecidos provenientes de animais de produção infectados. Esporadicamente podem ser observados abortos, orquite, epididimite, linfadenomegalia e artrites nos caninos (MEGID et al., 2007).

### **1.2.5 Interações entre patógeno, hospedeiros e ambiente**

Treanor et al. (2013) destacam que o avanço das comunidades humanas sobre as áreas de vida dos animais silvestres contribui para a fragmentação de habitats e, por consequência, das populações de animais que dependem destes. Algumas populações de veado-campeiro foram reduzidas ao longo do século passado, devido à fragmentação do seu habitat, à caça ilegal e às implicações do contato com o gado e espécies invasoras (DEMARÍA et al., 2003; GONZÁLEZ et al., 2010a). Na América do Sul, existem diversas metapopulações desse cervídeo, situação que leva endogamia e a depressão gênica (GONZÁLEZ et al., 2010b). Novas doenças introduzidas nestes ambientes poderiam encontrar organismos silvestres susceptíveis, agravando os riscos da extinção (MERINO et al., 1997).

Nos Estados Unidos, na área do Parque *Yellowstone*, populações de bisões (*Bison bison*) e de cervídeos (*Cervus elaphus*) têm apresentado altas taxas de exposição e de infecção por *Brucella abortus* (Treanor et al., 2013). Esta região é circundada por um vasto cinturão agropecuário e, ao longo de vários anos, têm ocorrido surtos de brucelose bovina nas propriedades que fazem limite com o parque (RHYAN et al., 2010)

Diversos autores (CROSS et al., 2007 e 2010, RIPPLE et al., 2010) têm observado que nos meses de inverno, há um aumento nos casos de brucelose em bovinos e que tal situação tem sido justificada pela intensificação do deslocamento das populações de *Cervus elaphus* para as pastagens das propriedades vizinhas ao parque, em busca de alimento (SCURLOCK et al., 2010). As pastagens limitadas do Parque do *Yellowstone* não suportam a carga animal das populações de bisões e cervídeos no inverno e, conseqüentemente, tais animais, subnutridos, apresentam um sistema imune suprimido e potencialmente suscetível à infecção por *Brucella* spp. (TREANOR, et al., 2013).

Além disso, as baixas temperaturas em países de clima temperado proporcionam meses de sobrevivência às *Brucella* spp. eliminadas no ambiente, sendo possível recuperar bactérias vivas do solo, vegetação ou carcaças de animais após até 81 dias (AUNE et al., 2011). No Pantanal ocorre situação oposta, caracterizada por longos períodos de temperaturas elevadas, no entanto, são escassas as informações que tratam da interferência do ambiente pantaneiro na epidemiologia da brucelose (e de outros agentes infecciosos em animais). Por esse motivo, são fundamentais inquéritos epidemiológicos e estudos de associação a fim de rastrear elementos que possam estar contribuindo para a manutenção de *Brucella* spp. nas interfaces patógeno-hospedeiro-ambiente (OIE, 2015).

Investigações apontam que relações interespecíficas de ruminantes com carnívoros poderiam regular a contaminação ambiental por *B. abortus*. Animais carniceiros podem tanto aumentar a disseminação das bactérias no ambiente, pela movimentação e espalhamento de carcaças ou fetos contaminados (AUNE et al., 2011). Como, por outro lado, podem se alimentar destes tecidos infectantes, reduzindo o tempo que estes permanecem no ambiente (USDA, 2012). Ainda, os carnívoros eliminam concentrações muito baixas de *B. abortus*, comprometendo o inóculo necessário para estabelecer uma infecção em outro animal (TESSARO & FORBES, 2004).

Comparativamente, *B. abortus* possui atividade de urease mais lenta que *B. suis* ou *B. canis*. A urease é um fator de virulência que está associado à sobrevivência em ambientes ácidos e a proteção de *Brucella* spp. durante a passagem no estômago (PERCIN, 2012). A menor

atividade de urease em *B. abortus* poderia comprometer a sua resistência ao pH ácido do estômago de carnívoros e explicaria a limitação da infecção nestes hospedeiros.

No Parque do Yellowstone, Maichak et al. (2009) constataram que nos locais ou períodos do ano em que as populações de *Cervus elaphus* apresentavam maiores densidades, as chances de contato com fetos abortados, placentas e outros tecidos contaminados com *B. abortus* eram proporcionalmente maiores que nas populações menos concentradas. Esses autores também monitoraram os animais que contribuíam para a redução destas fontes de infecção no ambiente. Dois carnívoros: a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) e o coiote (*Canis latrans*), se alimentaram dos fetos abortados, reduzindo o risco de infecção para as populações de cervídeos.

## **1.2.6 Programas sanitários**

### **1.2.6.1 Diagnóstico de situação**

Um programa de controle para a brucelose bovina deve ser pautado no conhecimento da situação epidemiológica para o qual será implementado, por duas razões principais: para melhor orientar as estratégias de ação de acordo com a frequência e distribuição da doença na população alvo; e por possibilitar o acompanhamento e ajustes, a fim de evitar desperdício de tempo e recursos (POESTER et al., 2009). Porém, no contexto do Pantanal, as atuais medidas sanitárias contra a brucelose bovina baseiam-se no mesmo programa aplicado em todo o Brasil, sem considerar características regionais, como o contato com animais silvestres e a importância destes para a brucelose local.

Para avaliar se uma dada espécie de animal silvestre, de fato, deveria ser considerada na cadeia epidemiológica da brucelose, além dos resultados de diagnóstico que confirmam a presença de *Brucella* spp. são necessárias outras informações, como: a concentração de bactérias necessária para o estabelecimento da infecção; se os hospedeiros são susceptíveis ou resistentes ao patógeno; o grau de contato entre animais silvestres e domésticos e os fatores ambientais que podem influenciar na transmissão (GODFROID, 2002).

Os resultados das ações contra a brucelose devem ser mensurados por técnicas de diagnóstico validadas, que precisam ser eficientes para identificar os verdadeiros casos que constituem uma doença. Godfroid et al. (2010) avaliam que as melhores técnicas de diagnóstico molecular, validadas em animais silvestres e domésticos, foram desenvolvidas para detectar sequências específicas de *Brucella* spp., como o gene 16S-23S, a sequência de inserção IS711

e o gene *bcs*31. Estas constituem técnicas, direcionadas para o uso em colônias cultivadas e tem sido aperfeiçoadas para amostras clínicas. Comparativamente, o teste da polarização fluorescente tem apresentado a melhor sensibilidade e especificidade em amostras de soro de animais silvestres e domésticos, sendo muito útil na detecção de infecções subclínicas (Godfroid et al., 2010).

A OIE (2015) cita as seguintes justificativas para desenvolver os testes de diagnóstico em doenças infecciosas que acometem animais silvestres: 1 - triagem das populações silvestres, visando à detecção precoce de patógenos e avaliação de tendências relacionadas à prevalência e incidência; 2 - rastreamento de vetores e amostras ambientais; 3 - confirmação de testes de triagem ou casos clínicos; 4 - certificação de animais livres para translocação ou consumo pelo homem; 5 - monitoramento da distribuição espacial de doenças e do estado imunológico de animais frente a alterações antrópicas e; 6 - para compreender as relações que influenciam no estabelecimento da doença, na tríade agentes infecciosos, hospedeiros e ambiente.

### 1.2.6.2 Medidas de controle

O conhecimento da situação epidemiológica local em seus diversos aspectos, tais como espécies envolvidas nas vias de transmissão, hospedeiros reservatórios, fatores de risco para a instalação de surtos de espécies e cepas predominantes do patógeno direcionam e melhoram a eficiência das medidas de controle (Godfroid et al., 2010).

Ações específicas para mitigar o impacto da brucelose na área do Grande *Yellowstone* incluíram a limitação do contato entre ruminantes silvestres e o gado (USDA, 2003), programas de vacinação estratégica (OLSEN et al., 2006), o fornecimento de feno no inverno para cervídeos e bisões (SCURLOCK et al., 2010) e a reintrodução estratégica de lobos. Esta última medida desencadeou uma intrincada cascata trófica, na qual os lobos, predando os cervídeos, reduziram as superpopulações que facilitam a disseminação de *B. abortus* e favoreceram a recuperação das pastagens naturais, que poderão dar maior aporte nutricional aos ruminantes durante o inverno, quando a susceptibilidade a brucelose é maior (RIPPLE et al., 2010, USDA, 2012).

Os melhores resultados no controle da brucelose advêm do manejo integrado dos fatores que elevam as taxas desta doença, por meio da conglomeração de órgãos governamentais, produtores rurais, autoridades sanitárias, cientistas e gestores do ambiente por um bem de interesse comum (TREANOR et al., 2013).

Essa forma de agir poderia ser adaptada à realidade do Pantanal onde, inicialmente, as estratégias de controle seriam aplicadas aos rebanhos bovinos e, com o aprofundamento do conhecimento, seria possível avaliar a necessidade de intervenções nas populações silvestres ou no ambiente. No entanto, é necessário reconhecer que o diagnóstico de situação da brucelose em determinadas regiões do mundo foi construído a partir de pesquisas de longa data, como no caso dos EUA, onde a situação atual é respaldada por um antigo programa de erradicação da brucelose (RAGAN, 2002).

Apenas a extrapolação das medidas sanitárias convencionais contra a brucelose parece ter pouca efetividade para a pecuária pantaneira. Há uma discrepância significativa entre as taxas de prevalência estimadas para a brucelose em diversas regiões do país em comparação ao Pantanal. De acordo com os dados mais recentemente publicados, a soroprevalência para bovinos na região é de 8,9% entre os indivíduos examinados e de 39,1% entre as propriedades de bovinos de corte (LEAL FILHO, 2013).

Um aspecto que exemplifica as particularidades da planície pantaneira é a característica inundação sazonal. Esta poderia interferir na ocorrência da brucelose de duas maneiras antagônicas: contribuindo para a disseminação das bactérias pelo transporte mecânico destas na água ou; reduzindo a carga de bactérias necessária para estabelecer uma infecção animal, por meio da diluição das fontes infectantes nos grandes volumes de água. Ainda, durante a inundação, as pastagens disponíveis para os animais ficam restritas às áreas mais altas, onde rebanhos domésticos e silvestres tendem a se concentrar.

A adoção por parte das fazendas pantaneiras de uma estação de monta na primavera para bovinos, com cerca de três meses de duração, além das vantagens produtivas já tradicionalmente apontadas (ABREU et al., 2003), poderia contribuir para o controle da eliminação de *Brucella* spp. no ambiente, uma vez que tende a concentrar os nascimentos (ou abortos) na estação seca (julho a outubro). Nesta época, o ambiente seria desfavorável para a sobrevivência da bactéria dada a estiagem que poderia causar o seu dessecamento.

A vacina RB51, tem apresentado níveis de produção de imunoglobulinas contra brucelose semelhantes à vacina B19, com a vantagem de poder ser utilizada em fêmeas bovinas não gestantes de qualquer idade (LAGE et al., 2008). Esta poderia ser uma boa ferramenta sanitária para melhorar a cobertura vacinal, que está abaixo da meta de 80% preconizada pelo PNCEBT (LEAL FILHO, 2013). Na região, muitos animais em idade vacinal não são imunizados, devido as seguintes características:

- a operação empregada para reunir o gado, em geral é lenta e laboriosa nas propriedades que possuem extensas áreas com poucas subdivisões;

- o sistema de criação animal é predominantemente extensivo, no qual, o gado pouco ou mal manejado tende a ser arreado;
- Limitações de infraestrutura, como energia elétrica, exigem improvisações que nem sempre propiciam boas condições para a conservação de grandes quantidades de imunoprofiláticos e;
- a limitada assistência técnica na região, tanto pela dificuldade de acesso como por aspectos culturais.

Essas condições comprometem a efetividade das medidas convencionais de manejo sanitário que foram planejadas para outras regiões do país.

Controlar doenças infecciosas em animais e regiões é estratégico, sobretudo para países exportadores de alimentos como o Brasil, onde um dos principais alicerces da matriz econômica nacional é a agropecuária. Com o avanço mundial no controle da brucelose, não seria surpresa se esta doença passasse a ser considerada uma barreira comercial para os produtos de origem animal. Esta perspectiva justifica a necessidade de ampliar o PNCEBT (BRASIL, 2006), incluindo o monitoramento de reservatórios silvestres ou asselvajados importantes para a epidemiologia da enfermidade.

À medida que as taxas de prevalência tendem a diminuir nos animais de produção, a situação em outros elos da cadeia epidemiológica assume maior importância na manutenção da doença nos ambientes (USDA, 2003). O desenvolvimento de um programa de vigilância da brucelose para animais silvestres em conjunto com o existente para bovinos e bubalinos, poderia otimizar recursos públicos, além de poder ser mais incisivo quanto a eficiência das medidas de controle tomadas.

## LITERATURA CONSULTADA

- ABREU, U.G. P, Cezar, I.M.; Torres, R.A. Análise bioeconômica da introdução de período de monta em sistemas de produção de rebanhos de cria na região do Brasil Central. R. Bras. Zootec., Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1198-1206, Oct. 2003
- ADAMS, L. Garry. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome. Veterinary microbiology, v. 90, n. 1, p. 553-561, 2002.
- AL DAHOUK, S. et al. Seroprevalence of Brucellosis, Tularemia, and Yersiniosis in Wild Boars (*Sus scrofa*) from North-Eastern Germany. Journal of Veterinary Medicine, Series B, v. 52, n. 10, p. 444-455, 2005.
- ALTON GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 190p.
- ANDERSON, Mark L. Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. Theriogenology, v. 68, n. 3, p. 474-486, 2007.

- AUNE, K., Rhyan, J. C., Russell, R., Roffe, T. J. and Corso, B. (2012), Environmental persistence of *Brucella abortus* in the Greater Yellowstone Area. *The Journal of Wildlife Management*, 76: 253–261. doi: 10.1002/jwmg.274
- BENGIS, R. G.; Kock, R. A.; Fischer, J. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*, v.21 (1), p.53-65.
- BENIRSCHKE, K. Deer Species *Cervus*, *Odocoileus*, etc. In: *Comparative Placentation*, Benirschke K. International Veterinary Information Service, Ithaca NY. 14p. 2005.
- BEVINS, Julia S. et al. The pathogenicity of *Brucella suis* biovar 4 for bison. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 32, n. 4, p. 581-585, 1996.
- BOSCHIROLI, M. L., S. Ouahrani-Bettache, V. Foulongne, S. Michaux-Charachon, G. Bourg, A. Allardet-Servent, C. Cazevieille, J. P. Liautard, M. Ramuz, and D. O’Callaghan. 2002. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 99:1544–1549.
- BRASIL 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 192p.
- CHEVELLE, N. F. e McCULLOUGH D. R. 1998. Brucellosis in the Greater Yellowstone Area, National Research Council, Washington DC, 207p.
- COSTA M. Brucelose Bovina e Equina In: *Doenças de Ruminantes e Equinos*. 2ª ed. Varela, São Paulo, v.1 p. 187-197. 2001.
- Cross P.C., Cole E.K., Dobson A.P., Edwards W.H., Hamlin K.L., Luikart G., Middleton A.D., Scurlock B.M., White P.J. Probable causes of increasing brucellosis in free-ranging elk of the Greater Yellowstone Ecosystem. *Ecol Appl*. 2010 Jan;20(1):278-88.
- Cross P.C., Edwards W.H., Scurlock B.M., Maichak E.J., Rogerson J.D. Effects of management and climate on elk brucellosis in the Greater Yellowstone Ecosystem. *Ecol Appl*. 2007 Jun;17(4):957-64.
- Daszak P., Cunningham A.A., Hyatt A.D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000 Jan 21;287(5452):443-9.
- DAVIS, Donald S. et al. Interspecific transmission of *Brucella abortus* from experimentally infected coyotes (*Canis latrans*) to parturient cattle. *Journal of wildlife diseases*, v. 24, n. 3, p. 533-537, 1988.
- DELRUE, Rose-May et al. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS microbiology letters*, v. 231, n. 1, p. 1-12, 2004.
- Demaría M.R., McShea W.J., Koy K., Maceira N.O. 2003. Pampas deer conservation with respect to habitat loss and protected area considerations in San Luis, Argentina. *Biological Conservation* 115: 121–13.
- Doganay G.D., Doganay M. *Brucella* as a potential agent of bioterrorism. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013 Apr;8(1):27-33.
- Dorneles, E.M.S., Pellegrin, A.O., Schabib Péres, I.A,H,F., Mathias, L.A., Muorão, G., Bianchi, R.C., Olifiers, N., Rocha, F.L., & Lage, A. P. 2014. Serology for brucellosis in free-ranging crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and brown-nosed coatis (*Nasua nasua*) from Brazilian Pantanal. **Cienc. Rural**, Santa Maria , v. 44, n. 12, p. 2193-2196, Dec. 2014.
- Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschöck M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl Environ Microbiol*. 2012 May;78(10):3753-5. doi: 10.1128/AEM.07509-11.
- Elisei C., Pellegrin A., Tomas W.M., Soares C.O., Araújo F.R., Funes-Huacca M.E., Rosinha G.M.S. 2010. Evidência molecular de *Brucella* spp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(6):503-509.

- ESSENBERG, Richard C. et al. Sugar metabolism by *Brucellae*. *Veterinary microbiology*, v. 90, n. 1, p. 249-261, 2002.
- Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Martin, B.M., Cummins, D.R., Miller, W.G., 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 448–452.
- FISCHER, D.; LORENZ, N.; HEUSER, W.; KÄMPFER, P.; SCHOLZ, H. C.; LIERZ, M. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 43, n. 3, p. 625-628, 2012.
- Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*. 21(1):277-286.
- GODFROID, Jacques; NIELSEN, Klaus; SAEGERMAN, Claude. 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. *Revue Scientifique Et Technique*, v. 32, n. 1, p. 27-42, 2013.
- Godfroid J, DeBolle X, Roop RM, O'Callaghan D, Tsolis RM, Baldwin C, Santos RL, McGiven J, Olsen S, Nymo IH, Larsen A, Al Dahouk S, Letesson JJ. The quest for a true One Health perspective of brucellosis. *Rev Sci Tech*. 2014 33(2):521-38.
- González S., Cosse M., Braga F.G., Vila A.R., Merino M.L., Dellafiore C., Cartes J.L., Maffey L., Dixon M.G. 2010a. Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus 1758 In: *Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer FUNEP/IUCN São Paulo* pp. 119-132.
- González S., Duarte J.M.B e Maldonado J.E. 2010b. Molecular phylogenetics and evolution. *Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer FUNEP/IUCN, São Paulo* pp. 12-17
- Higgins J, Stuber T, Quance C, et al. Molecular Epidemiology of *Brucella abortus* Isolates from Cattle, Elk, and Bison in the United States, 1998 to 2011. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(10):3674-3684. doi:10.1128/AEM.00045-12.
- Ito F.H., Vasconcellos S.A., Bernardi F., Nascimento A.A., Labruna M.B., Arantes I.G. 1998. Evidência sorológica de brucelose e leptospirose e parasitismo por Ixodídeos em animais silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Ars Veterinária* 14 (3): 302-310.
- JAIN, Neeta; BOYLE, Stephen M.; SRIRANGANATHAN, Nammalwar. Effect of exogenous erythritol on growth and survival of *Brucella*. *Veterinary microbiology*, v. 160, n. 3, p. 513-516, 2012.
- Jiménez de Bagüés, M. P., Terraza, A., Gross, A., & Dornand, J. 2004. Different Responses of Macrophages to Smooth and Rough *Brucella* spp.: Relationship to Virulence . *Infection and Immunity*, 72(4), 2429–2433.
- LAGE A. P. et al. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 2008. v.32, n.3, p.202-212.
- LEAL FILHO, J.M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Mato Grosso do Sul. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2013.
- MACKINTOSH, C.; HAIGH, J. C.; GRIFFIN, F. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, v. 21, n. 1, p. 249-264, 2002.
- Maichak, E. J. M., Brandon, Curlock, Jared D. Rogerson, Laura L. Meadows, Andrea E. Barbknecht, William H. Edwards, and Paul C. CrossSource: *Journal of Wildlife Diseases*, 45(2):398-410. Published By: Wildlife Disease Association DOI: <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.398>

- Mathias L.A., Girio R.J.S. & Duarte J.M.B. 1999. Serosurvey For Antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 35(1):112-114.
- Mayer-Scholl, A. Draeger A., Göllner, C. Scholz H. C., Nöckler K. 2010. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of Microbiological Methods* 80 112–114.
- MEGID, Jane et al. Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, p. 1583-1585, 2007.
- Merino, M. L., Gonzales, S., Leeuwenberg, F. Rodrigues, F.H.G., Pinder, L. e Tomas, W.M. 1997. Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. Jaboticabal. FUNEP. pp. 42-58.
- Monteiro L.A.R.C., Pellegrin A.O., Ishikawa M.M., Osório A.L.A.R. 2006. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 26(4):217-222.
- Moreno, E., Cloeckert, A., Moriyon, I., 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology* 90, 209–227.
- NEILAND, Kenneth A.; MILLER, Lawrence G. Experimental *Brucella suis* type 4 infections in domestic and wild Alaskan carnivores. *Journal of wildlife diseases*, v. 17, n. 2, p. 183-189, 1981.
- OIE , 2015 World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Chapter 3.6.7 Principles and methods for the validation of diagnostic tests for infectious diseases applicable to wildlife. (Version adopted in May 2014). Disponível em: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>
- Olsen SC, Fach SJ, Palmer MV, Sacco RE, Stoffregen WC, Waters WR. Immune responses of elk to initial and booster vaccinations with *Brucella abortus* strain RB51 or 19. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Oct;13(10):1098-103.
- OMS. 1986. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Organización Mundial de la Salud, Genebra. Serie de Informes Técnicos. 740:149.
- Paulin L.M. & Ferreira Neto J.S. 2003. O Combate à Brucelose Bovina: situação brasileira. 1ª ed. Funep, Jaboticabal, SP. 154p.
- Paulin, L.M. 2003 Brucelose. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.70, n.2, p.239-249.
- Peck, D. E. Brucellosis in the Greater Yellowstone Area: An Economic Diagnosis. 2010. Western Agricultural Economics Association. vol. 9(01).
- Percin D. *Microbiology of Brucella*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013; 8(1):13-7.
- Poester F., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Gonçalves V.S.P., Lage A.P., Roxo E., Mota P.M.P.C, Müller E.E., Ferreira Neto J.S. 2009. 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.
- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Deonnelly W.J., Leonard F.C. 2005. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Editora Art Med, Porto Alegre. 512p
- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Deonnelly W.J., Leonard F.C. 2005. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Editora Art Med, Porto Alegre. 512p.
- Ragan V.E. 2002. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the Unites States. *Veterinary Microbiology* 90 (2002) 11-18.
- Rhyan J.C., Nol .P, Quance C, Gertonson A, Belfrage J, Harris L, Straka K, Robbe-Austerman S. Transmission of brucellosis from elk to cattle and bison, Greater Yellowstone area, U.S.A., 2002-2012. *Emerg Infect Dis*. 2013 Dec;19(12):1992-5. doi: 10.3201/eid1912.130167.

- RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, p. 83-92, 2008.
- Ridler A. *Brucella ovis* infection in deer. *Surveillance*. v. 28, n.3, p. 06-08, 2001.
- Ripple, W.J., Painter, L.E., Beschta, R.L., Gates, C.C. Wolves, Elk, Bison, and Secondary Trophic Cascades in Yellowstone National Park. *The Open Ecology Journal*. 2010. 3,31-37
- Santos, R.L., MARTINS, T.M., BORGES, A.M., PAIXÃO, T.A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 33, n. 6, p. 759-764, June 2013 .
- Santos S.A. 2002. Aspectos Agro e Zoológicos. *In: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal*, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) pp 14-17.
- Schabib-Péres, I.A.H.F. 2010 Ocorrência de *Brucella* spp. e *Leptospira interrogans* e variáveis de risco associadas às taxas reprodutivas do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Sudoeste da Nhecolândia, Corumbá, MS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 87p.
- Scurlock, B.M., Edwards, W.H. Status of brucellosis in free-ranging elk and bison in Wyoming. *J Wildl Dis*. 2010 Apr;46(2):442-9.
- Serrano E, Cross PC, Beneria M, Ficapal A, Curia J, Marco X, Lavín S, Marco I. Decreasing prevalence of brucellosis in red deer through efforts to control disease in livestock. *Epidemiol Infect*. 2011 Oct;139(10):1626-30. doi:10.1017/S095026881100095
- TESSARO, Stacy V.; FORBES, Lorry B.; TURCOTTE, Claude. A survey of brucellosis and tuberculosis in bison in and around Wood Buffalo National Park, Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 31, n. 3, p. 174, 1990.
- TESSARO SV, FORBES LB. Experimental *Brucella abortus* infection in wolves. *J Wildl Dis*. 2004 Jan;40(1):60-5.
- Tiller RV, Gee JE, Frace MA, Taylor TK, Setubal JC, Hoffmaster AR, De BK. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Sep;76(17):5837-45. doi: 10.1128/AEM.00620-10
- Treanor JJ. Integrating ecology with management to control wildlife brucellosis. *Rev Sci Tech*. 2013 Apr;32(1):239-47..
- UHART M., Mangine P., Gauvez C., Corti P., Milano F., Jorge M., Girio R., Mathias L., Schettino A., Catena M., Terragno R. e Aprile G. Bacterial Diseases. *In: Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer* .FUNEP/IUCN, São Paulo pp.342-362. 2010.
- USDA 2003. Brucellosis in Cervidae: Uniform Methods and Rules. United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service APHIS. Department of Agriculture, 23p.
- USDA 2008. Evaluation of the brucellosis and bovine tuberculosis status of bison and elk in Elk Island National Park, Canada. Veterinary Services Animal and Plant Health Inspection Service United States. Department of Agriculture. 63 p.
- USDA. 2012. Gray Wolf Damage Management in Montana for the Protection of Livestock, Other Domestic Animals, Human Safety, and Other Resources. 112p.
- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Grayon, M., 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 35, 292–295.
- WALKER, R.L. *Brucella*. *In: Microbiologia Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 185-191. 2003.
- Whatmore, A. M. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* 9 (2009) 1168–1184.

- Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perrett LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C, Scholz HC, Dick EJ Jr, Hubbard G, Schlabritz-Loutsevitch NE. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). International journal of systematic and evolutionary microbiology 64.12 (2014): 4120-4128.
- WHATMORE, A. M.; DALE, E. J.; STUBBERFIELD, E.; MUCHOWSKI, J.; KOYLASS, M.; DAWSON, C.; GOPAUL, K. K.; PERRETT, L. L.; JONES, M.; LAWRIE, A. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). JMM Case Reports, v. 2, n. 1, 2015.
- Witter J.F. 1981. Brucellosis. Infectious diseases of wild mammals. 2nd ed. Iowa State Pr, Iowa, p.280-287.
- XAVIER, M., PAIXÃO, T., HARTIGH, A.B., TSOLIS, R., SANTOS, R.L. Pathogenesis of *Brucella* spp. The Open Veterinary Science Journal, v. 4, n. 1, 2010.

**ARTIGO 1. – Formato: Pesquisa Veterinária Brasileira**

**Fatores de risco e soroprevalência da brucelose em veado-campeiro  
(*Ozotoceros bezoarticus*) em contato com bovinos no Pantanal Sul-mato-  
grossense<sup>1</sup>**

Igor A.H.F. Schabib-Péres<sup>2,3\*</sup>, Namor P. Zimmermann<sup>2</sup> e Aiesca O. Pellegrin<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Schabib-Péres, I.A.H.F., Zimmermann, N.P., Juliano, R.S., Ferreira, F., Mathias, L.A. & Pellegrin, A.O. 2016. **[Risk factors and seroprevalence of brucellosis in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in contact with cattle in the Pantanal Sul-mato-grossense.]** Fatores de risco e soroprevalência da brucelose em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) em contato com bovinos no Pantanal Sul-mato-grossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Bacteriologia, Sanidade Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pantanal, R. 21 de Setembro, 1880, Corumbá, MS, 79320-900, Brazil. E-mail: [igor.peres@embrapa.br](mailto:igor.peres@embrapa.br)

The knowledge and the vigilance of infections caused by *Brucella* spp. in free-living mammals are strategic for animal brucellosis control programs in several countries. The livestock farming in the Brazilian Pantanal has developed in an extensive production system where the cattle coexists with species of wild and feral animals. The pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) is a relatively abundant native ruminant, with biology and habits similar to cattle, characteristics that make this animal a epidemiological indicator for interspecific spill over pathogens. We conducted a serological survey on deer populations in contact with cattle in the Pantanal of Mato Grosso do Sul. The aim of the study was to determine the seroprevalence of brucellosis in pampas deer and cattle in the same areas and identify factors significantly associated with positive and negative outcomes of brucellosis in cervids. Using the fluorescence polarization assay with variable cut-off ( $mP = \Delta mP$  of sample - mean  $mP$  of negative controls) we find a seroprevalence of 6.59% (6/91) for brucellosis in the pampas deer. We also proceed the brazilian official diagnostic tests for bovine brucellosis: the buffered acidified plate antigen test (rose bengal) and the 2-mercaptoethanol, which showed no positive reactions to the pampas deer, but were positive in respectively 10% and 1.58% of cattle sera tested. The hydrologic periods, flood and ebbing in the Pantanal (January-June) was identified as a factor significantly associated with the occurrence of brucellosis positive deer when compared to the period of drought and flooding (July-December), odds ratio 23.33 (95% CI = 2.54 to 214.48;  $p = 0.0017$  in the Fisher's Exact Test).

**INDEX TERMS:** wildlife, *Brucella* spp., risk factors, Pantanal, fluorescence polarization

<sup>1</sup> Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Av. Filinto Müller, 2443, Vila Ipiranga, CEP 79074-460, Campo Grande, MS, Brasil. \* Autor para correspondência: [igor.peres@embrapa.br](mailto:igor.peres@embrapa.br)

<sup>3</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pantanal. R. 21 de Setembro, 1880, Bairro Nossa Senhora de Fátima, Caixa postal: 109, Corumbá, MS, 79320-900, Brasil.

**RESUMO.-** O conhecimento e o monitoramento das infecções causadas por *Brucella* spp. em mamíferos de vida livre é estratégico para os programas de controle e erradicação da brucelose animal em diversos países. O Pantanal brasileiro tem a pecuária de corte como uma de suas bases econômicas, sendo esta desenvolvida em um sistema de produção extensivo onde o gado convive com espécies silvestres e asselvajadas. O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) é um ruminante nativo de relativa abundância, com biologia e hábitos similares aos bovinos, características que fazem dele um bom indicador epidemiológico para circulação de patógenos interespecíficos. Com o objetivo de determinar a soroprevalência da brucelose no veado-campeiro e em bovinos nas mesmas áreas e de identificar os fatores associados significativamente com os resultados positivos e negativos da brucelose nos cervídeos, realizamos inquérito sorológico em populações de veados em contato com o gado no Pantanal Sul-mato-grossense. Utilizando a técnica da polarização fluorescente com ponto de corte variável ( $\Delta mP = mP$  da amostra – média dos mP dos controles negativos), encontramos uma soroprevalência de 6,59% (6/91) para a brucelose em veados. Procedemos também os testes de diagnóstico oficiais do antígeno acidificado tamponado e do 2-mercaptoetanol, os quais não apresentaram nenhuma reação positiva para os veados, mas foram positivos em, respectivamente, 10% e 1,58% dos soros bovinos testados. Identificamos o período hidrológico da cheia e vazante pantaneira (janeiro a junho) como um fator significativamente associado a ocorrência de veados positivos quando comparado ao período da seca e enchente (julho a dezembro), *odds ratio* de 23,33 (I.C. 95% =  $2,54 \geq \mu \leq 214,48$ ;  $p = 0,0017$  no teste exato de Fisher).

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** animais silvestres, *Brucella* spp., fatores de risco, Pantanal, polarização fluorescente.

## INTRODUÇÃO

As interfaces epidemiológicas existentes entre os animais de vida livre, domésticos e o homem têm chamado a atenção de pesquisadores e profissionais que atuam na manutenção da saúde animal e da segurança alimentar.

No Pantanal Sul-mato-grossense diversas espécies silvestres convivem com o gado bovino que constitui uma das principais atividades econômicas locais. A pecuária regional é desenvolvida predominantemente em pastagens naturais, por meio do sistema de produção extensivo (Abreu 2002, Santos 2002), onde os bovinos utilizam as mesmas áreas que os animais silvestres nativos (Lacerda 2008).

Estudos desenvolvidos na região têm indicado a presença dos mesmos patógenos em espécies silvestres, asselvajadas e domésticas. Foi reportada a presença de anticorpos contra *Brucella* spp. ocorrendo nas mesmas sub-regiões do Pantanal em bovinos (Pellegrin et al. 2006, Chate et al. 2009, Leal Filho, 2013), porcos-monteiros (*Sus scrofa*) (Paes et al. 2008), lobinhos (*Cerdocyon thous*) e quatis (*Nasua nasua*) (Dorneles et al. 2014). No veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) o DNA de *Brucella* spp. foi detectado no sangue por métodos moleculares (Elisei et al. 2010) e por provas sorológicas e moleculares realizadas em paralelo (Schabib-Péres 2010).

Os fatores que podem influenciar nas taxas de positividade para a brucelose em veados-campeiros no Pantanal não foram ainda esclarecidos, sendo escassos os trabalhos que tratam do assunto. Em pesquisa anteriormente realizada, não foram encontradas associações entre a idade de veados-campeiros e as taxas de positividade para a brucelose no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) (Schabib-Péres 2010). Neste mesmo trabalho, foram comparadas as fêmeas que tinham ou não filhotes após a estação reprodutiva, não havendo associação significativa com as taxas de positivos ou negativos para brucelose.

Em bovinos e cervídeos a principal via de infecção é a ingestão de água ou pastagens contaminadas com secreções e tecidos, principalmente a placenta, infectados por *Brucella* spp. (Brasil 2006; Uhart et al. 2010). No Pantanal, de acordo com o período do ano ocorrem inundações das pastagens que perduram por meses. Essas inundações podem restringir as áreas secas aglomerando os animais e, por consequência, favorecer a disseminação de agentes etiológicos eliminados no ambiente

Os países que atingiram estágios avançados no controle e erradicação da brucelose nos rebanhos domésticos, direcionaram os seus programas sanitários para a vigilância e monitoramento da *Brucella* spp. em animais silvestres e/ou asselvajados que poderiam constituir reservatórios epidemiológicos. Esta é a atual situação dos EUA, mais precisamente na chamada Grande Área do Yellowstone, parque nacional que dispõe de estrutura de controle e vigilância próprias para a brucelose no veado-vermelho (*Cervus elaphus*) e no bisão (*Bison bison*) (Godfroid 2002).

Para que o controle da brucelose seja eficiente em animais silvestres, domésticos e no homem é importante o desenvolvimento de estudos multidisciplinares, buscando contemplar as diversas interações que regulam a sua ocorrência (Godfroid et al. 2011). *Brucella* spp. são bactérias que possuem uma grande capacidade adaptativa, podendo infectar diferentes hospedeiros ou evadir da resposta imune (Gomez et al., 2013).

Até o momento, não foram realizados inquéritos sorológicos que objetivem determinar a prevalência da brucelose nas espécies silvestres do Pantanal. Em geral, os estudos realizados com animais silvestres foram pontuais e não contemplaram uma amostragem significativa deste bioma. Investigações em paralelo, abordando animais silvestres e bovinos nos mesmos locais e período de tempo, não foram feitas até o momento na região.

Os objetivos deste estudo foram estimar as prevalências sorológicas para a brucelose no veado-campeiro e nos bovinos que compartilham as mesmas áreas de vida, além de identificar os prováveis fatores associados a uma maior taxa de positividade para a brucelose no veado-campeiro.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Local, período do estudo e amostragem**

Entre março de 2012 e novembro de 2013 foram coletadas amostras biológicas de 91 veados-campeiros e de 190 bovinos de corte que viviam em simpatria. Em cada propriedade rural amostrada, foram coletados entre seis e vinte veados sexualmente maduros e entre 20 e 40 vacas vacinadas para brucelose com idade superior a dois anos.

Seis propriedades rurais das sub-regiões pantaneiras da Nhecolândia e Paiaguás foram incluídas neste estudo mantendo-se, pelo menos, cinco quilômetros de distância entre as populações de cervídeos para que não houvesse a sobreposição de suas áreas de vida, estimadas em 1,7 Km<sup>2</sup> no Pantanal (Lacerda 2008). Os locais de amostragem foram selecionados com base nas maiores densidades do veado-campeiro e bovinos, conforme Mourão et al. (2000).

### **Captura e identificação dos cervídeos**

Em cada propriedade, foi realizado um reconhecimento prévio das áreas de contato entre bovinos e veados-campeiros. Definidos os pontos, as capturas dos cervídeos foram realizadas de forma ativa, procurando os animais no campo e selecionando no máximo dois indivíduos por grupo.

Para a contenção dos veados, foi realizada uma aproximação circular centrípeta, lenta, a pé ou com veículo até uma distância entre 10 e 30 metros do animal, na qual era possível utilizar um rifle veterinário para dardos anestésicos (JM Double Barrel Rifle, Dan-Inject Aps<sup>®</sup>, Dinamarca) de forma segura. O protocolo de contenção química utilizado foi descrito por Schabib-Péres (2010), sendo modificada em 25% para cima a dose por quilograma da tiletamina-zolazepam, de modo a garantir a sedação.

Durante a contenção química, todos os cervídeos tiveram a temperatura corporal, as frequências cardíaca e respiratória e os reflexos neurológicos periféricos monitorados a cada 10 ou 15 minutos. Todos os indivíduos foram inspecionados clinicamente e receberam fluidoterapia, além de medicação específica quando houve necessidade.

Todos os veados-campeiros foram identificados com brinco de poliuretano (Modelo Tip Tag para ovinos, 36 mm x 11 mm, Allflex<sup>®</sup>, Brasil) próprios para a marcação de ruminantes e com coleiras numeradas.

### **Coleta e análises das amostras clínicas**

Cerca de 20 ml de sangue dos cervídeos e bovinos foi coletado por punção venosa para a obtenção de soro sanguíneo. O material foi mantido entre 2 e 8°C em isopor com bolsas de gelo até o término de cada jornada de trabalho, sendo então processado e aliquotado no laboratório montado no campo e armazenado em *freezer* a - 20 °C ou botijão de nitrogênio líquido a -196 °C.

No laboratório de bacteriologia da Embrapa Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul, o soro dos veados e bovinos foi examinado quanto à presença de anticorpos para a brucelose pelo teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e pelo teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol (2-ME), conforme o Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) (Brasil 2006).

O teste de diagnóstico da Polarização Fluorescente (FPA) para a pesquisa de anticorpos para *Brucella* spp. foi realizado no departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo. O soro dos veados foi analisado por um kit comercial de FPA (*Brucella's* Antibody Test Kit, Diachemix®, EUA), utilizando duas diferentes diluições: 1:50 (20 µl de soro para cada 980 µl de solução tampão) e 1:100 (10 µl de soro para cada 990 µl de solução tampão), seguindo as orientações do fabricante e a metodologia descrita por Mathias et al., (2010).

Os resultados foram interpretados com base na diferença obtida entre o valor de milipolarização (mP) da amostra e a média obtida de três controles negativos. As diferenças entre os valores de mP que estavam acima de 20, caracterizavam uma amostra como positiva para a brucelose; entre 10 e 20 mP eram consideradas suspeitas, devendo ser retestadas em duplicata e; abaixo de 10 mP eram negativas (conforme orientações do fabricante). As amostras retestadas foram consideradas positivas se, em pelo menos uma das duplicatas, fosse avaliada a condição de suspeita ou de positividade.

### **Delineamento experimental e análises dos dados**

Realizou-se um inquérito sorológico transversal para a determinação das prevalências da brucelose em bovinos e veados-campeiros que coabitavam as mesmas áreas e um estudo da associação dos fatores de risco relacionados ao diagnóstico positivo da brucelose nos cervídeos. Estabeleceu-se uma amostragem mínima baseada em experiências anteriores, na prevalência estimada para as doenças (10%), num erro aceitável de 10% (95% de confiança) e na capacidade operacional da equipe de coleta.

Os bovinos foram considerados positivos para a brucelose quando apresentaram reações de aglutinação no teste do 2-ME ou quando permaneceram como inconclusivos após o reteste. Para os veados-campeiros a FPA foi considerada na discriminação de animais sororreagentes ou não para a *Brucella* spp.

A prevalência amostral ( $P_a$ ) para a brucelose no veado-campeiro e nos bovinos foi calculada pela fórmula  $P_a = n/N \times 100$ , onde:  $n$  = número de indivíduos positivos na amostra e  $N$  = número total de indivíduos amostrados.

Foram registradas em fichas de campo as informações sobre as características do ambiente, do manejo do gado na propriedade e dos indivíduos capturados, para a avaliação dos fatores de risco para brucelose em veados.

Os dados foram armazenados em planilhas computacionais e categorizados em tabelas de contingência do tipo 2 x 2. Foi aplicado o teste exato de Fisher (monocaudal, com  $p < 0,05$ ) para constatar se as frequências observadas diferiam estatisticamente entre as categorias avaliadas. Para as categoriais significativas foi feito então o estudo da intensidade de associação por meio da medida do *Odds Ratio* (*OR*) entre as variáveis do inquérito de campo e os resultados da sorologia para brucelose. Para cada categoria a *OR* foi considerada significativa quando o valor 1 não era incluído dentro do intervalo de confiança a 95%. Os cálculos foram realizados nos pacotes computacionais BioEstat 4.0 (Sociedade Civil Mamiarauá/CNPq, 2006, Belém/PA, Brasil) e no sítio eletrônico *VassarStats* (Lowry 2014).

#### **Autorização ambiental e avaliação bioética**

Este estudo foi aprovado pelo comitê de bioética e experimentação animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) por meio do certificado nº 368 de 14 de outubro de 2011. Por envolver uma espécie silvestre, também foi submetido ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), obtendo autorização para ser executado conforme os documentos Nº 20029-3 e 25317-1 e 2.

### **RESULTADOS**

Foi encontrada uma soropositividade para a brucelose de 6,59% (6/91) em veados-campeiros, pelo teste da FPA. Cinco veados apresentaram reações positivas na diluição soro/tampão de 1/100 e um indivíduo na diluição 1/50 (Quadro 1.). As provas do AAT e do 2-ME não detectaram veados positivos para brucelose.

Dentre os bovinos, 10% (19/190) dos soros foram positivos na prova do AAT e 1,58% (3/190) no teste confirmatório do 2-ME. Neste último teste, um animal apresentou reações inconclusivas em duas oportunidades (teste e reteste), sendo considerado como positivo de acordo com as normas do PNCEBT (Brasil 2006).

Quadro 1. Testes de sorodiagnóstico para *Brucella* spp. realizados nos veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*), que foram considerados positivos para brucelose neste estudo.

Identificação	FPA 1:100 <sup>1</sup>	FPA 1:50 <sup>2</sup>	AAT <sup>3</sup> e 2-ME <sup>4</sup>
Veado Campeiro 1	Positivo	Negativo	Negativos
Veado Campeiro 2	Positivo	Negativo	Negativos
Veado Campeiro 3	Positivo	Negativo	Negativos
Veado Campeiro 4	Positivo	Negativo	Negativos
Veado Campeiro 5	Positivo	Negativo	Negativos
Veado Campeiro 6	Negativo	Positivo	Negativos

<sup>1</sup> – FPA = Teste de polarização fluorescente com soro diluído em tampão na proporção de 1:100.

<sup>2</sup> – FPA = Teste de polarização fluorescente com soro diluído em tampão na proporção de 1:50.

<sup>3</sup> – AAT: Teste do antígeno acidificado tamponado (rosa-bengala).

<sup>4</sup> – 2-ME = Teste do 2-Mercaptoetanol.

A análise de associação das variáveis com os resultados positivos para a brucelose em veados-campeiros é apresentada no Quadro 2. Observa-se que somente a associação entre o regime hidrológico no Pantanal e a ocorrência da brucelose em veado-campeiro foi significativa ( $p < 0.0017$ ). A intensidade da associação entre o período hidrológico no Pantanal e a ocorrência da brucelose em veado-campeiro está registrada no Quadro 3.

Quadro 2. Frequências de resultados positivos e negativos categorizados para as possíveis variáveis associadas a ocorrência da brucelose no veado-campeiro, no Pantanal Sul-Mato-Grossense

Variáveis	Categorias	Teste da FPA <sup>1</sup>		p <sup>2</sup>
		Positivos	Negativos	
Sexo	Fêmeas	5	66	0,6055
	Machos	1	19	
Sub-região pantaneira	Nhecolândia	5	56	0,3511
	Paiaguás	1	29	
Regime hidrológico	Cheia (janeiro a junho)	5	15	<b>0,0017</b>
	Seca (julho a dezembro)	1	70	
Teste do 2-ME <sup>3</sup> no rebanho bovino	Positivo*	5	50	0,2314
	Negativo	1	35	
Teste do AAT <sup>4</sup> no rebanho bovino	Positivo	5	72	0,5997
	Negativo	1	13	

<sup>1</sup> – FPA: Prova da polarização fluorescente; <sup>2</sup> – Teste exato de Fischer monocaudal; <sup>3</sup> – 2-ME: Prova do 2-mercaptoetanol; <sup>4</sup> – AAT: Teste do antígeno acidificado tamponado

Quadro 3. Intensidade da associação entre o regime hidrológico e a ocorrência de brucelose diagnosticada pela FPA<sup>1</sup> em veados-campeiros do Pantanal Sul-mato-grossense

Variáveis	Categorias	Teste de FPA <sup>1</sup>		OR <sup>2</sup>	IC (95%) <sup>3</sup>
		Positivo	Negativo		
Regime hidrológico	Cheia (janeiro a junho)	5	15	<b>23,33</b>	2,54 ≥ μ ≤ 214,46
	Seca (julho a dezembro)	1	70		

<sup>1</sup> – FPA: Prova da polarização fluorescente; <sup>2</sup> – OR: Odds ratio; <sup>3</sup> – IC (95%): intervalo de confiança a 95%.

Na Figura 1. Estão representadas as propriedades rurais e as populações de veados-campeiros e bovinos que participaram deste estudo. As populações que tiveram pelo menos um indivíduo positivo, identificado pela FPA para veados e 2-ME para bovinos, foram marcadas em vermelho, as que só apresentaram reações negativas estão em azul.

As proporções de veados positivos e negativos para a brucelose pelo período hidrológico pantaneiro (cheia e seca) estão representadas na Figura 2.

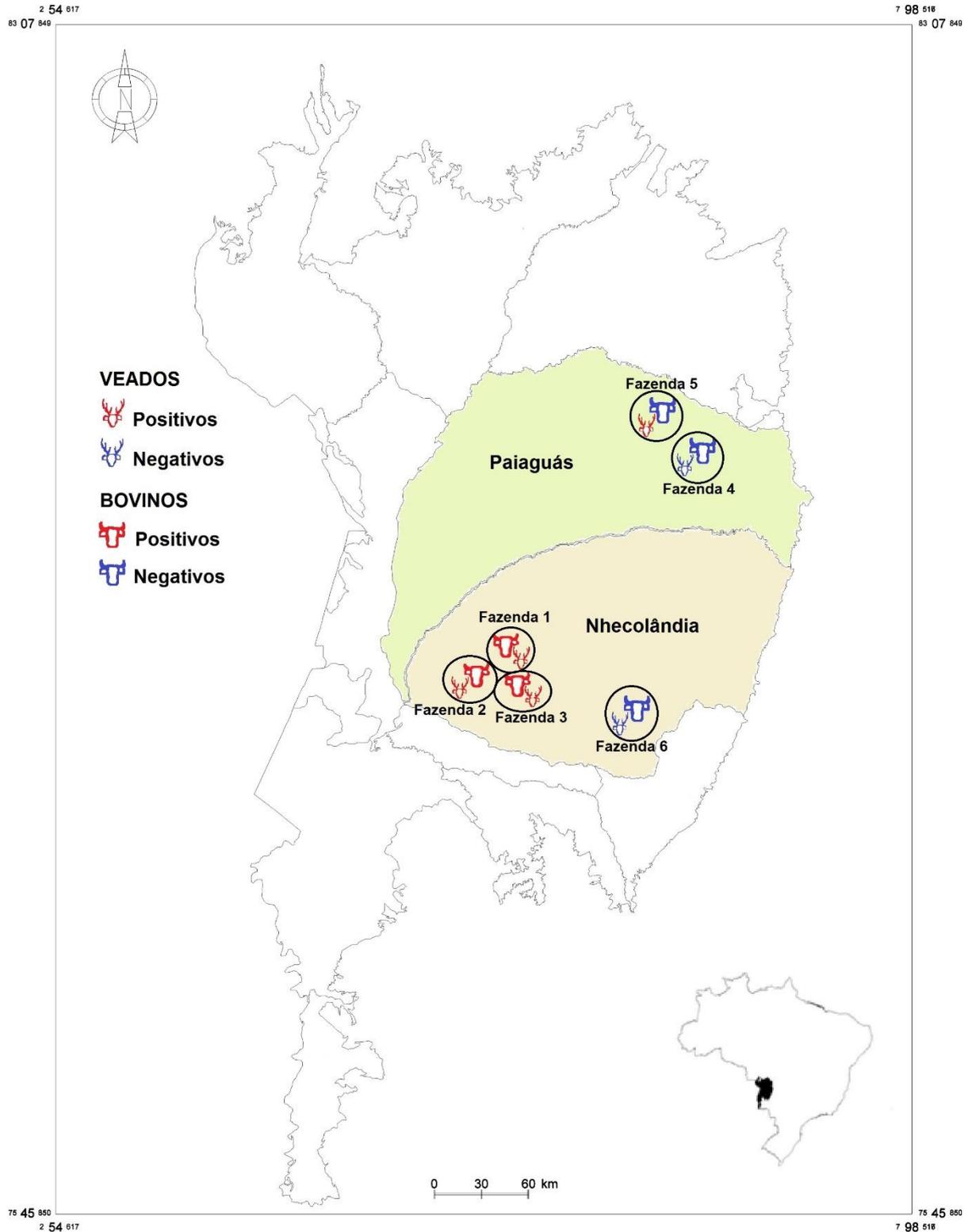


Figura 1. Representação espacial dos locais amostrados com as populações de veados-campeiros e rebanhos bovinos positivos e negativos para a brucelose nas sub-regiões da Nhecolândia e do Paiguás no Pantanal Sul-mato-grossense

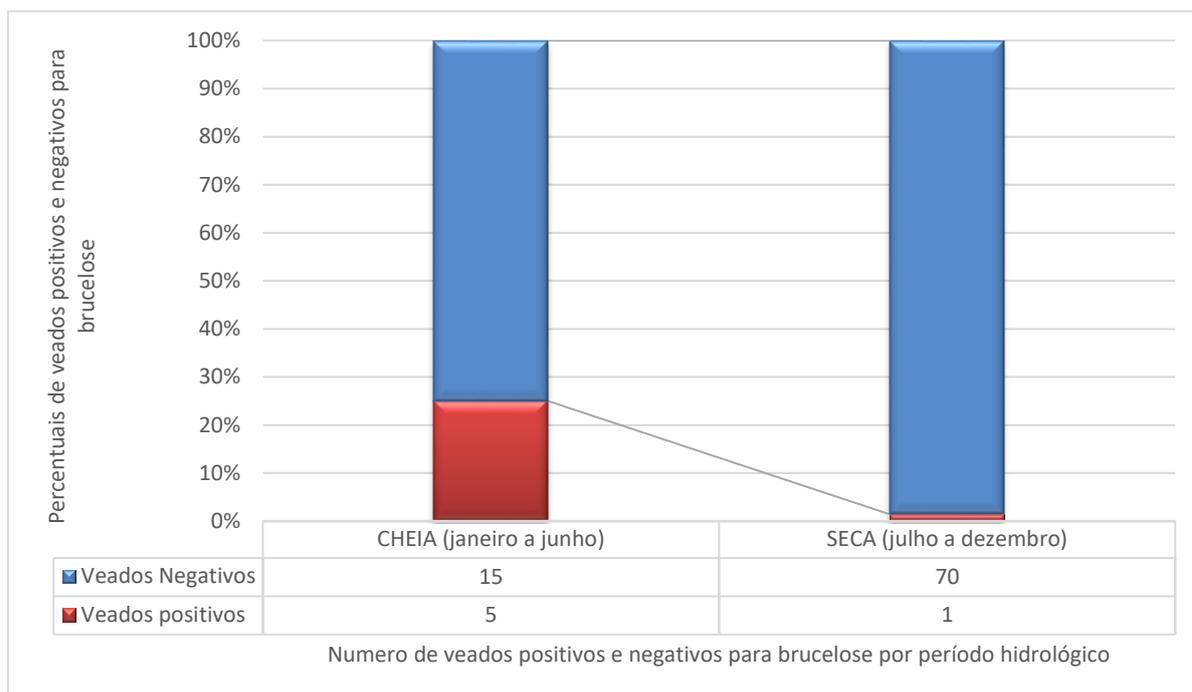


Figura 2. Proporção de veados-campeiros positivos e negativos para brucelose categorizados pelos períodos hidrológicos do Pantanal.

## DISCUSSÃO

A taxa de positividade encontrada para bovinos na prova do AAT (10%) foi equivalente a reportada por Chate et al. (2009) (12,6%), que utilizaram os dados de um inquérito epidemiológico realizado em 1998. Aparentemente, a doença parece estar estável no Pantanal, no entanto, estudos que utilizam apenas o AAT como teste de diagnóstico para brucelose tendem a superestimar as prevalências. Essa prova é recomendada para a triagem diagnóstica devido a sua alta sensibilidade, mas os positivos devem ser confirmados por outro teste mais específico. O AAT está sujeito à reações falso positivas inespecíficas, relacionadas a outras bactérias, além de sofrer interferências de anticorpos vacinais (Brasil 2006).

Encontramos, na prova confirmatória do 2-ME, 1,58% de reações positivas para brucelose em bovinos, dados que corroboram os descritos por Pellegrin et al. (2006), que estimaram em 1,36% a prevalência para brucelose no gado pantaneiro, utilizando o mesmo método de diagnóstico. Observa-se que as taxas de brucelose em bovinos são relativamente mais baixas, quando empregadas as técnicas de diagnóstico mais específicas. Na Nhecolândia e Paiaguás os pecuaristas criam o gado visando a produção de bezerros, que são geralmente transferidos ou vendidos para completar a fase de crescimento e engorda em fazendas do planalto (Santos et al. 2002). Desta forma, a introdução de bovinos adultos de fora do Pantanal

nos rebanhos locais é bastante limitada, característica que pode contribuir para a relativa estabilidade da brucelose na região.

O último inquérito estadual para a brucelose em bovinos, reportou uma prevalência de 8,9% para o Pantanal, utilizando a prova oficial do 2-ME (Leal Filho 2013). Essa frequência de positividade esteve bem acima do encontrado neste estudo, podendo ser justificada pela grande abrangência amostral do inquérito estadual, que contemplou propriedades rurais com características heterogêneas e em diferentes municípios pantaneiros e, principalmente, pelas diferentes metodologias de amostragem adotadas. O nosso delineamento amostral foi pautado nas áreas de maior densidade do veado-campeiro (Mourão et al. 2000), já que os nossos objetivos eram estimar as taxas de brucelose para este cervídeo e, apenas, para os bovinos presentes nos mesmos locais de ocorrência do veado-campeiro.

Somente a FPA foi capaz de detectar anticorpos anti-*Brucella* spp. em veados-campeiro. Esses resultados podem ser justificados pela maior sensibilidade e especificidade da FPA em comparação ao AAT e ao 2-ME. Isso foi demonstrado em bovinos (McGiven et al. 2003), bubalinos (Paulin et al. 2012) e cervídeos (Gall et al. 2001), sendo a FPA eficiente inclusive para avaliar amostras hemolisadas que podem interferir nas provas convencionais de sorologia por aglutinação.

O “padrão ouro” de diagnóstico para a *Brucella* spp. é o isolamento microbiológico, que pode ser feito a partir de fetos abortados, da placenta ou de tecidos infectados (Mackintosh et al. 2002, Godfroid 2002). Futuramente, tentativas de isolamento para *Brucella* spp. no veado-campeiro poderiam contribuir para a validação da FPA neste cervídeo, principalmente se essas técnicas de diagnóstico fossem realizadas em paralelo. Porém, o cultivo microbiológico da *Brucella* spp. envolve estrutura, aparato de equipamentos, treinamento de pessoal e normas rigorosas de biossegurança que podem inviabilizar alguns estudos.

Alternativamente aos métodos microbiológicos, os testes de diagnóstico utilizados em animais silvestres podem ser avaliados com base nos resultados obtidos em amostras de referência positivas e negativas. As amostras selecionadas como parâmetros devem ter sido examinadas em provas de alta sensibilidade e especificidade de diagnóstico, além de serem relacionadas taxonomicamente com as espécies a serem avaliadas. Fatores inerentes aos patógenos, hospedeiros e a epidemiologia da doença no ambiente da população estudada também devem ser considerados na interpretação dos resultados (OIE 2015).

Levantamentos sorológicos para brucelose em veado-campeiro no Pantanal têm apresentado grande variação de resultados. Mathias et al. (1999) examinaram o soro de 17

veados-campeiros do Pantanal e de 24 do Parque Nacional das Emas, utilizando as técnicas do AAT e da fixação do complemento (FC) e não encontraram animais positivos. Ainda assim, estes autores destacaram a importância de prosseguir com o monitoramento de animais silvestres, sobretudo nas áreas onde existam altas prevalências em bovinos.

No presente estudo, três das quatro populações de cervídeos em que havia ao menos um indivíduo positivo para a brucelose, estavam localizadas em propriedades onde o rebanho bovino foi positivo. Da mesma forma, as duas populações de veado campeiro negativas para a brucelose coincidiram com gado negativo (Figura 1). Contudo, não foi possível evidenciar estatisticamente a associação entre as populações bovinas e de cervídeos positivas para a brucelose, devido ao limitado universo amostral considerado: seis populações de veado campeiro e seis rebanhos bovinos.

Em planícies alagáveis africanas, semelhantes ao Pantanal, Muma et al. (2011) avaliaram a soroprevalência para a brucelose em duas populações diferentes de antílopes *Kobus leche kafiensis* e *Kobus leche smithemani*. Os resultados apontaram que as manadas destes ruminantes silvestres, que compartilharam as pastagens com bovinos infectados por *Brucella* spp., tiveram significativamente maiores prevalências para a brucelose que as manadas que não tinham contato com o gado.

Nos Estados Unidos, a introdução de *B. abortus* em locais e animais de vida livre é atribuída ao homem, por intermédio dos rebanhos domésticos (Olsen 2010). Quando um patógeno atinge um novo hospedeiro, duas situações são possíveis: o hospedeiro pode morrer ou eliminar completamente o agente infectante – hospedeiro *dead end* ou; a infecção pode se estabelecer, de forma que o hospedeiro mantenha o patógeno no ambiente, podendo inclusive “devolver” o agente etiológico à sua população de origem - *spill back* (Wobeser 2006, Olsen & Tatum 2010).

A importância da brucelose em animais silvestres pode ser subestimada quando são feitas generalizações ou abordagens que não consideram aspectos epidemiológicos específicos para as populações estudadas. Aguirre et al. (1995) encontraram nos parques nacionais dos Estados Unidos 2% (8/456) de positividade para *B. abortus* no veado-vermelho (*Cervus elaphus*), pelo teste de soroaglutinação em cartão, demonstrando uma prevalência relativamente baixa da doença no país como um todo. Nesse levantamento os únicos animais sororreagentes pertenciam a região conhecida como Área do Grande *Yellowstone*.

No Parque do *Yellowstone*, por conta da escassez de alimentos durante o inverno, as autoridades distribuem feno em sítios de alimentação para os veados. Essa medida objetiva melhorar a condição imunológica dos cervídeos, além de evitar que os animais migrem para as

pastagens das fazendas vizinhas ao parque, entrando em contato com o gado (Treanor et al. 2015). Porém, as grandes densidades de veados nos locais de alimentação foram associadas a altas prevalências de brucelose (entre 10 e 30%), enquanto que nos grupos menos densos, e que não utilizam estas áreas, as taxas de brucelose variaram entre 2 e 3% (Cross et al. 2013). Esses dados evidenciam a importância de uma investigação epidemiológica detalhada que possibilite a avaliação dos diversos fatores que afetam as frequências estimadas para a brucelose em populações silvestres.

O papel epidemiológico do veado-campeiro para a brucelose no Pantanal, ainda é incerto. As prevalências sorológicas são relativamente baixas, o que limita maiores percepções sobre a dinâmica dessa enfermidade. As tentativas de isolamento são desafiadoras, dada a logística da região. No entanto, técnicas de genotipagem como a *variable number tandem repeat* (VNTR) tem se mostrado eficientes para a caracterização de espécies e cepas de *Brucella* spp. Essas informações sobre as bactérias, associadas aos hospedeiros em que ocorrem, podem auxiliar na elucidação das vias de transmissão interespecíficas (Mugizi et al. 2015).

Os resultados de *OR* evidenciaram que durante a inundação pantaneira houve cerca de 23 vezes mais cervídeos positivos para brucelose que no período seco (Quadro 3). Essa forte intensidade da associação entre o período hidrológico do Pantanal e a ocorrência da brucelose em veado-campeiro está representada na Figura 2, onde é possível observar que a maior proporção de veados positivos ocorreu no período da cheia (20%), enquanto que na seca apenas cerca de 1% dos indivíduos foram positivos. As informações sugerem que a transmissão hídrica pode ter um importante papel na epidemiologia da brucelose no Pantanal.

A *Brucella* spp. pode sobreviver por até quatro meses na água ou em solo úmido (OMS 1986, Brasil 2006) e a principal fonte de infecção para bovinos e animais silvestres são as fêmeas gestantes infectadas que, ao abortar ou parir, podem eliminar grandes quantidades de *Brucella* spp. no ambiente, contaminando pastagens, água e solo (OMS 1986, Cheville & McCullough 1998, Brasil, 2006).

As parições dos bovinos no Pantanal concentram-se no final do ano, predominantemente, entre setembro e novembro (Santos, 2009). As novilhas primíparas, categoria mais susceptível à brucelose, tendem a parir mais tardiamente (Brasil, 2006), podendo contaminar o ambiente com *Brucella* spp. no início das chuvas (meados de outubro). O ambiente mais úmido ou inundado poderia favorecer a sobrevivência e a disseminação da bactéria. Essa hipótese poderia justificar porque as taxas de veados-campeiros positivos para a brucelose foram significativamente mais frequentes no período da cheia pantaneira.

O nosso estudo confirma que o veado-campeiro está exposto à *Brucella* spp. na região, já que em todas as propriedades onde foram identificados bovinos positivos, também ocorreram veados positivos. A inundação sazonal que ocorre no Pantanal esteve significativamente associada a brucelose diagnosticada nos cervídeos. Na cheia pantaneira as chances de encontrar cervídeos positivos para a doença foram 23 vezes maiores do que no período de estiagem.

Sugere-se, para pesquisas futuras, a continuidade deste estudo em um delineamento longitudinal, monitorando a brucelose simultaneamente em cervídeos e bovinos, nas mesmas propriedades e períodos de tempo. Esse formato compensaria a dificuldade em se obter um universo amostral representativo para as populações silvestres, além de viabilizar o acompanhamento da evolução da brucelose, por meio da estimativa da incidência nas propriedades reamostradas.

**Agradecimentos.-** Ao professor Luis Antonio Mathias, Medicina Veterinária Preventiva, FCAV, Unesp, Jaboticabal, por ceder o seu laboratório e equipamentos para a realização dos testes de polarização fluorescente. Ao Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO-MG por ceder os antígenos para os testes sorológicos do AAT e 2-ME. Aos funcionários da Embrapa Pantanal e proprietários rurais que compreenderam a importância e colaboraram com este estudo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul pelo financiamento deste projeto.

#### LITERATURA CITADA

- Abreu U.G.P. 2002. Sistema de Produção de Gado de Corte do Pantanal Importância Econômica In: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) 9-13
- Aguirre A. A.; Hansen D. E.; Starkey E. E.; Mclean R.G. 1995. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States Preventive Veterinary Medicine 21:313-322
- Brasil 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 190p.
- 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, J.S.; Ferreira Neto, J.S. 2009 Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, 61(1): 46-55.
- Cheville N. F. e McCullough D. R. 1998. Brucellosis in the Greater Yellowstone Area, National Research Council, Washington DC, 207p.
- Cross P. C., Maichak E. J., Brennan A., Scurlock B. M., Henningsen J., & Luikart G. 2013. An ecological perspective on *Brucella abortus* in the western United States. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties. 32:79-87,
- Dornelles E.M.S.; Pellegrin A.O.; Schabib Péres I.A.H.F., Mathias L.A.; Mourão G.M.; Bianchi R.C., Olifiers N.; Rocha F.L.; Lage A.P. 2014. Serology for brucellosis in free-ranging crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and brown-nosed coatis (*Nasua nasua*) from Brazilian Pantanal. Ciência Rural. 44(12) :2193-2196.
- Elisei C., Pellegrin A., Tomas W.M., Soares C.O., Araújo F.R., Funes-Huacca M.E., Rosinha G.M.S. 2010. Evidência molecular de *Brucella* spp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado

- campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(6):503-509.
- Gall D., Nielsen K., Forbes L., Cook W., Leclair D., Balsevicius S., Kelly L., Smith P. e Mallory M. 2001. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *Journal of Wildlife Diseases, Wildlife Disease Association* 37(1):110–118.
- Godfroid J. 2002 Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*, 21:277-286.
- Godfroid J.; Scholz H.C.; Barbier T.; Nicolas C.; Wattiau P.; Fretin D.; Whatmore A.M.; Cloeckaert A.; Blasco J.M.; Moriyon I.; Saegermanj C.; Mumak J.B.; Al Dahoukl S.; Neubauern H.; Letessond J.J. 2011. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine*, 102:118-131.
- Gomez, G., Adams L.G, Rice-Ficht, A., Ficht, T.A. 2013. Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. *Front Cell Infect Microbiol*, 3:17. doi: 10.3389/fcimb.2013.00017.
- Lacerda A.C.R. 2008 Ecologia e estrutura social do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Brasília, Brasília, DF. 194p.
- Leal Filho J.M. 2013. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Mato Grosso do Sul. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2013.
- Lowry, R. 2014. VassarStats: Web site for statistical computation. Department of Psychology, Vassar Condição corporal, variação de peso e desempenho reprodutivo de vacas de cria em pastagem nativa no Pantanal Acessado: 10/11/2014.
- Mackintosh, C., Haigh, J.C., Griffin, F. 2002 Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*. 21(2):249-263.
- Mathias L.A., Girio R.J.S. & Duarte J.M.B. 1999. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 35(1):112-114.
- Mathias L.A., Corbellini L.G., Maia L.N., Fagundes K., Paulin L.M.S., Samartino L.E., Serqueira M.A., Soares Filho P.M., & Souza M.M.A. 2010. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Ciência Rural*. 40(10):2135-2140.
- McGiven, J.A., Tucker, J.D., Perrett, L.L., Stack, J.A., Brew, S.D., MacMillan, A.P. 2003 Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods*, v.278, p.171-178,.
- Mourão, G., Coutinho M., Mauro R., Campos Z., Tomás W., Magnusson W. 2000. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the pantanal Wetland of Brasil. *Biol Cons* 92:175-183.
- Mugizi, D. R., Boqvist, S., Nasinyama, G. W., Waiswa, C., Ikwap, K., Rock, K., Lindhal, E., Magnusson, U., Erume, J. 2015. Prevalence of and factors associated with *Brucella* seropositivity in cattle in urban and peri-urban Gulu and Soroti towns of Uganda. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 77(5), 557–564. <http://doi.org/10.1292/jvms.14-0452>
- Muma, J.B., Munyeme M., Matope G., Siamudaala V.M., Munangádu HM, Matandiko W, Godfroid J, Skjerve E, Tryland M. 2011. *Brucella* seroprevalence of the Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) and Black lechwe (*Kobus leche smithemani*): Exposure associated to contact with cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 100:256-260.
- OIE , 2015 World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Chapter 3.6.7 Principles and methods for the validation of diagnostic tests for infectious diseases applicable to wildlife. (Version adopted in May

- 2014). Disponível em: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>
- Olsen S. C. 2010. Brucellosis in the United States: role and significance of wildlife reservoirs. *Vaccine* 28:73-76.
- Olsen, S., Tatum, F., 2010. Bovine brucellosis. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 26, 15–27.
- OMS. 1986 Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Sér. Inf. Téc. 740:149.
- Paes R.C.S., Ribeiro O.C., Monteiro L.A.R.C., Figueiredo A.O., Neto A.A.C., Oliveira J.M., Da Rosa G.O., Keuroglia A., Piovezan U. & Herrera H.M. 2009. Enfermidades de Ocorrência no Porco Monteiro (*Sus scrofa*) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. *Suiform Soundings*, 9(1) IUCN, p.29-34 (Resumo).
- Paulin, L.M.S.; Samartino, L.E.; Conde, S.B.; Federsoni, I.S.P.; Ferreira, F.; Amaku, M.; Ferreira Neto, J.S. Fluorescence polarization assay, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-C) and indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Ciência Rural*. [online]. 2012, vol.42, n.9
- Pellegrin, A.O., Leite, R.M.H., Sereno, J.R.B., Lage, A.P., Leite, P.C., Leite, R.C. e Ravaglia, E. 2006 Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares Comunicado Técnico 58, Corumbá, 4 p.
- Santos, S.A. 2002 Aspectos Agro e Zoológicos In: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) pp 14-17.
- Santos, S.A., Abreu, U.G.P.; Souza, G.S, e Catto, J.B. 2009. Condição corporal, variação de peso e desempenho reprodutivo de vacas de cria em pastagem nativa no Pantanal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 38:354-360.
- Schabib-Péres, I.A.H.F. 2010 Ocorrência de *Brucella* spp. e *Leptospira interrogans* e variáveis de risco associadas às taxas reprodutivas do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Sudoeste da Nhecolândia, Corumbá, MS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 87p.
- Maintenance of brucellosis in Yellowstone bison: linking seasonal food resources, host-pathogen interaction, and life-history trade-offs.
- Treanor, J.J., Geremia, C., Ballou, M.A., Keisler, D.H., White, P.J., Cox, J.J., Crowley, P.H. Maintenance of brucellosis in Yellowstone bison: linking seasonal food resources, host-pathogen interaction, and life-history trade-offs *Ecol Evol*. 2015.; 5(17):3783-99. doi: 10.1002/ece3.1633.
- Uhart, M., Mangine, P., Gauvez, C., Corti, P., Milano, F., Jorge, M., Girio, R., Mathias, L., Schettino, A., Catena, M., Terragno, R. e Aprile, G. 2010 Bacterial Diseases In: *Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer FUNEP/IUCN*, São Paulo, pp.342-362
- Wobeser, G.A. 2006 *Essentials of Disease in Wild Animals*. Blackwell Publishing, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 243p.

## ARTIGO 2. – Formato: Pesquisa Veterinária Brasileira

**Detecção de *Brucella* spp. em mamíferos silvestres sorologicamente positivos no Pantanal sul-mato-grossense<sup>1</sup>**

Igor A.H.F. Schabib-Péres<sup>2,3\*</sup>, Namor P. Zimmermann<sup>2</sup> e Aiesca O. Pellegrin<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Schabib-Péres, I.A.H.F., Zimmermann, N.P & Pellegrin, A.O. 2016. [***Brucella* spp. detection in seropositive wild mammals from Pantanal, Mato Grosso do Sul State**] Detecção de *Brucella* spp. em mamíferos silvestres sorologicamente positivos no Pantanal sul-mato-grossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Bacteriologia, Sanidade Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pantanal, R. 21 de Setembro, 1880, Corumbá, MS, 79320-900, Brazil. E-mail: [igor.peres@embrapa.br](mailto:igor.peres@embrapa.br)

We report results for brucellosis in free-living animals from Pantanal, with wide sample range and with direct and indirect diagnostic tests that detect the presence of *Brucella* spp. Between 2012 and 2015, serum samples, tissues and swabs of secretions were collected from 130 pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), 50 crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and 22 brown-nosed coati (*Nasua nasua*). All individuals shared the environment with livestock in farms. Using Rose-Bengal Test, 2-mercaptoethanol and FPA to identify animals exposed to *Brucella* spp. Bacteriological cultivate and real-time PCR was used for brucella DNA detection from screening of tissues, confirming the positive results of these samples by other molecular techniques (*nested*PCR, *Multiplex*PCR, and gene sequencing). We adopted the most sensitive serological test (FPA) for found *Brucella* sp positivity rates in 5.4% (7/129) pampas deer, 24% (12/50) crab-eating fox and 13.6% (3/22) red-nose coati. It was not possible to isolate *Brucella* spp. from none sample collected, however, we detected *Brucella* spp., DNA in four deer, seven crab-eating fox and three coatis, from the same samples submitted to microbiology. By *Nested*PCR, we confirmed the initial detection of the pathogen in two crab-eating fox and one coati and obtained DNA amplicons for sequencing. The remaining three samples were confirmed in sequencing with 100% alignment with *Brucella* spp., DNA against 90% for *Ochrobactrum anthropi*, and 65% for *B. abortus* biovar 1 S19. Finally, we performed a PCR with just one of *Multiplex*-specific primers used to identify species of *Brucella* spp. In one of the three sequenced samples (a coati), was possible concluded that not vaccinal *Brucella abortus* smooth was present.

**INDEX TERMS:** serology, PCR, *Ozotoceros bexoarticus*, *Cerdocyon thous*, *Nasua nasua*.

<sup>1</sup> Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Av. Filinto Müller, 2443, Vila Ipiranga, CEP 79074-460, Campo Grande, MS, Brasil. \* Autor para correspondência: [igor.peres@embrapa.br](mailto:igor.peres@embrapa.br)

<sup>3</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pantanal. R. 21 de Setembro, 1880, Bairro Nossa Senhora de Fátima, Caixa postal: 109, Corumbá, MS, 79320-900, Brasil.

**RESUMO.-** Reportamos resultados de brucelose para animais de vida-livre no Pantanal com ampla abrangência amostral e com testes de diagnóstico diretos e indiretos, que detectam a presença de *Brucella* spp. Entre 2012 e 2015 foram coletadas amostras de soro, tecidos e suabes de secreções de 130 veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*), 50 lobinhos (*Cerdocyon thous*) e 22 quatis (*Nasua nasua*). Todos estes indivíduos compartilhavam do ambiente com o gado em propriedades de exploração pecuária. Na sorologia utilizamos as técnicas do AAT, 2-ME e FPA para identificar os animais expostos à *Brucella* spp. Para diagnóstico direto do agente utilizamos o cultivo microbiológico e a PCR em tempo-real para a triagem dos tecidos, confirmando a positividade destas amostras por outras técnicas moleculares (*nested* PCR, PCR *Multiplex* e sequenciamento genético). As taxas de positividade foram assumidas a partir da prova sorológica mais sensível (FPA), onde foram encontrados 5,4% (7/129) veados-campeiros, 24% (12/50) lobinhos e 13,6% (3/22) sororreagentes à *Brucella* spp. Não foi possível isolar *Brucella* spp. de nenhuma das amostras coletadas com esse intuito, no entanto, detectamos DNA da bactéria em quatro veados, sete lobinhos e três quatis, a partir das mesmas amostras submetidas à microbiologia. Por meio da *Nested* PCR, confirmamos a detecção inicial do patógeno em dois lobinhos e um quati e, obtivemos DNA amplificado para sequenciamento. As três amostras restantes, foram confirmadas no sequenciamento com 100% de alinhamento com DNA de *Brucella* spp., contra 90% com *Ochrobactrum anthropi* e 65% de *B. abortus* biovar 1 B19. Por fim, realizamos uma PCR, com apenas um dos *primers Multiplex*-específicos utilizados para identificar espécies de *Brucella* spp. Em uma das três amostras sequenciadas (o quati) foi possível concluir que *Brucella abortus* lisa não vacinal estava presente.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** sorologia, PCR, *Ozotoceros bezoarticus*, *Cerdocyon thous*, *Nasua nasua*.

## INTRODUÇÃO

O Pantanal brasileiro é conhecido mundialmente por sua biodiversidade e abundância de animais de vida livre. Também é referência na criação de gado de corte em ambiente nativo, pouco alterado e em sintonia com a natureza (Santos 2002). Tais características propiciam um intenso contato interespecífico em animais que podem ser acometidos por doenças em comum (Wobeser 2006).

Nas regiões em torno do Parque Nacional do *Yellowstone*, nos EUA, *Brucella abortus* foi introduzida no ambiente por meio do gado infectado. A bactéria se adaptou a hospedeiros da fauna nativa, tornando-se uma doença endêmica de difícil controle (Cheville 1988, Godfroid et al. 2014). Autoridades sanitárias e pecuaristas trabalham em conjunto para limitar a ocorrência da brucelose entre os cervídeos e bisões, evitando que a doença ressurgja no gado considerado livre (USDA 2012, Rhyan et al. 2010).

No Pantanal, a soroprevalência da brucelose em bovinos foi estimada em 8,9% pela prova oficial do 2-Mercaptoetanol (2-ME) (Leal Filho 2013). Em animais silvestres da região, estudos pontuais demonstraram taxas de positividade sorológicas variáveis: 13,2% em lobinhos (*Cerdocyon thous*) e 8.8 % em quatis (*Nasua nasua*), ambas pela prova da polarização fluorescente (FPA) (Dorneles et al. 2014); 0% de positividade em soro de veados-campeiros

(*Ozotoceros bezoarticus*) utilizando o AAT e a técnica de fixação de complemento (FC) (Mathias et al. 1999); 10,2% (AAT) e 3,4 (%) também em soro de veado-campeiro. Para esse cervídeo, foram reportados resultados em que foi possível a detecção do DNA de *Brucella* spp. por reações em cadeia de polimerase (PCR) a partir do sangue total, obtendo 11,6% (Schabib-Péres 2010) e 20,4% (Elisei et al. 2010) de positividade.

Os levantamentos sanitários conduzidos em animais de vida livre possuem limitações por não serem, na maioria dos casos, validados. A reduzida capacidade na obtenção de amostras de qualidade e os métodos de diagnóstico empregados podem interferir na interpretação dos resultados (OIE 2015).

Os objetivos deste estudo foram: realizar um levantamento sorológico para a brucelose em veado-campeiros, lobinhos e quatis de vida livre no Pantanal e; identificar a presença ou não de *Brucella* spp. nos tecidos e secreções de animais silvestres, por meio de técnicas diretas de diagnóstico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Período e área de estudo

Entre março de 2012 e janeiro de 2015, foram realizadas capturas e coletas de amostras biológicas em *Cerdocyon thous* (lobinho), *Nasua nasua* (quati) e *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro) em contato com o bovinos da região. O estudo compreendeu as sub-regiões pantaneiras da Nhecolândia e do Paiaguás, com áreas de 26921 e 27082 Km<sup>2</sup>, respectivamente, o que representa cerca de 40% do território do Pantanal (Silva et al. 1998).

Treze diferentes propriedades rurais foram contempladas no estudo (Apêndice A), sendo que a distribuição espacial dos pontos amostrados teve como base mapeamentos aéreos, que indicaram as maiores densidades do veado-campeiro nas sub-regiões da Nhecolândia e do Paiaguás (Mourão et al. 2000). Foi assumido que os carnívoros estariam mais amplamente distribuídos, e que a amostragem seria delimitada em função das populações do veado-campeiro, predominantes em fazendas com maiores áreas de campos abertos e vazantes.

Com auxílio de programas de geoprocessamento (Google Earth®, TrackMaker®, MapSource®), foi possível planejar as viagens e avaliar espacialmente quais áreas poderiam constituir os pontos de coleta dentro das propriedades.

### Animais, capturas e monitoramento

Para a composição do tamanho da amostra, foi considerada uma prevalência de 50%, o erro aceitável foi estabelecido em 10% e o intervalo de confiança em 95%. Com esses valores, 120 indivíduos seriam suficientes para compor a amostragem. Este número foi preconizado apenas

para o veado-campeiro, por limitações de tempo e por este animal ser, fisiológica e taxonomicamente, o mais semelhante e relacionado ao gado (Merino et al. 1997, Lacerda 2008). Os carnívoros foram capturados oportunamente, porém sempre em áreas de ocorrência do gado.

A captura dos veados-campeiros foi baseada no descrito por Schabib-Péres (2010). Era realizada uma aproximação lenta, até uma distância entre 10 e 30 metros do animal, sendo disparado um dardo anestésico a partir de um rifle veterinário (JM Double Barrel Rifle, Dan-Inject Aps<sup>®</sup>, Dinamarca). As doses e fármacos descritos para a contenção química (Schabib-Péres 2010) foram aumentadas em 25% na concentração total da tiletamina e zolazepam por dardo. Esse ajuste tornou a indução anestésica e a sedação mais efetivas, sem comprometer os parâmetros físicos. Foi administrado um antagonista de receptores alfa-2-adrenérgicos, para auxiliar a reversão parcial da anestesia no término dos procedimentos (Schabib-Péres 2010).

Para os carnívoros, foram utilizadas essencialmente armadilhas de metal, do tipo *Tomahawk*, semelhantes a gaiolas (50 x 50 x 70 cm ou 50 x 50 x 90 cm), com plataforma de desarme interno e fechamento frontal. Estas eram dispostas próximas a fontes de água, pastagens-maternidade, currais e carcaças de animais mortos, ou ainda, paralelamente à borda de matas, estradas ou interiores de capões. As iscas utilizadas foram: bacon, ração pastosa para gato, abóbora cabotiã umedecidas com óleo de fígado de bacalhau e creme de amendoim.

De duas a três vezes por dia as armadilhas eram conferidas, presas e protegidas com folhagens densas para evitar injúrias aos animais que permanecessem confinados até o momento em que fossem encontrados. Água era fornecida e reabastecida constantemente. Na contenção dos carnívoros, foi empregada a tiletamina associada ao zolazepam, numa dosagem que variou entre quatro e oito mg da combinação/Kg de peso corporal.

### **Coletas e preparo das amostras**

Foi coletado entre 10 e 20 ml de sangue venoso para a obtenção de soro. Suabes bacteriológicos, secos e com meio de transporte de Stuart, foram impregnados com secreções vaginais, leite ou colostro, fezes da ampola retal e com material obtido a partir da punção aspirativa com agulha fina (PAAF) de linfonodos superficiais (cervicais superficiais e poplíteos). O aspirado de linfonodo foi realizado após tricotomia e assepsia prévia da pele, sendo dividido entre um tubo estéril para congelamento e os suabes bacteriológicos.

Oportunamente, foram realizadas necropsias em um lobinho e um quati, encontrados mortos com pouco grau de autólise. Dois veados-campeiros também foram necropsiados: um feto abortado e uma veada adulta que foi eutanasiada, após sofrer fratura provocada pelo impacto do dardo anestésico. De modo geral, os seguintes órgãos foram coletados: fígado, rins, baço, linfonodos cervical superficial e poplíteo, pulmões, estômago, útero e placenta.

No tempo entre as coletas e o retorno ao laboratório de campo, todas as amostras eram mantidas refrigeradas entre 2 e 8°C em isopor com bolsas de gelo. O soro foi alíquotado em tubos criogênicos e as demais amostras acondicionadas em embalagens apropriadas. Ambos eram congelados em *freezer* a -20 °C ou botijão de nitrogênio líquido a -196 °C, até o momento em que fossem submetidos aos testes de diagnóstico.

### **Diagnóstico sorológico**

No laboratório de bacteriologia da Embrapa Pantanal, o soro sanguíneo foi examinado quanto à presença de anticorpos para a brucelose pelo teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e pelo 2-Mercaptoetanol (2-ME), seguindo a metodologia do manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) (Brasil 2006).

O teste de Polarização Fluorescente (FPA) para a pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* spp. foi realizado no departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista (UNESP) *Campus* de Jaboticabal, São Paulo. Os soros sanguíneos coletados foram analisados por meio de um kit comercial de FPA (*Brucella's* Antibody Test Kit, Diachemix<sup>®</sup>, EUA), que possui como antígeno um lipopolissacarídeo contendo a cadeia O de *Brucella* spp. conjugada com fluoresceína. Duas diluições foram empregadas em paralelo, nas proporções de 1:50 (20 µl de soro para cada 980 µl de solução tampão) e 1:100 (10 µl de soro para cada 990 µl de solução tampão).

Conforme as orientações do fabricante, a interpretação dos resultados baseou-se na diferença entre o valor de milipolarização da amostra testada e a média de três controles negativos ( $\Delta mP = mP$  da amostra –  $mP$  médio de três controles negativos). As amostras foram consideradas negativas quando apresentavam  $\Delta mP$  menor que 10. Para  $\Delta mP$  entre 10 e 20 a amostra era considerada suspeita e retestada em duplicata. Valores de  $\Delta mP$  acima de 20 caracterizavam uma amostra como positiva para a brucelose. As amostras retestadas foram consideradas positivas se, em pelo menos uma das duplicatas, fosse avaliada a condição de suspeita ou de positividade.

### **Diagnóstico microbiológico**

O cultivo de *Brucella* spp. requer altos níveis de biossegurança dado o seu caráter zoonótico. Esta fase da pesquisa foi realizada no setor de Doenças Bacterianas do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), em Pedro Leopoldo-MG, seguindo as técnicas de cultivo de *Brucella* spp. descritas por Alton et al. (1988). No dia anterior às sementeiras bacterianas, as amostras eram transferidas para refrigeradores para que descongelassem lentamente.

Os suabes em meio de Stuart foram aplicados diretamente nas placas de cultivo, em meio Agar Triptose, acrescido de 5% de soro fetal bovino. Quando ocorria a contaminação dos meios, as amostras eram recultivadas em novas placas acrescidas do suplemento seletivo de Farrell (*Brucella* selective supplement Code: SR0083, Farrell, Oxoid®), para limitar a proliferação de bactérias que possam inibir o crescimento de *Brucella* spp. As amostras dos órgãos eram dissolvidas com solução peptonada em sacos próprios para *stomacher* e maceradas por cerca de cinco minutos, quando a fase liquefeita da amostra era transferida para as placas de cultivo. Essas amostras de órgãos, juntamente com os suabes anais, foram semeadas em duplicata, nos meios de triptose com 5% de soro fetal bovino, com e sem suplemento seletivo de Farrell (Alton et al. 1988).

Incubamos as placas a 37°C em estufas microbiológicas com controle de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), que era fornecido numa proporção de 5% do ar atmosférico. O crescimento das bactérias era monitorado, nos três primeiros dias a cada 24 horas e, posteriormente, a cada 48 h, por até duas semanas de incubação, conforme os procedimentos adotados no LANAGRO-MG. As colônias, com características morfológicas compatíveis com *Brucella* spp., foram transferidas para novas placas com Agar Triptose e soro fetal bovino (Alton et al. 1988), onde proliferavam, produzindo a massa bacteriana necessária às técnicas de diagnóstico de *Brucella* spp.

### **Diagnóstico molecular**

#### **Extração do DNA**

Dois diferentes métodos para a obtenção de DNA foram utilizados neste estudo. O primeiro foi aplicado diretamente na massa bacteriana cultivada, onde uma alçada bacteriológica de 10 microlitros era dissolvida em 1 ml de solução salina. A suspensão bacteriana era inativada a 65°C por uma hora, podendo ser utilizada diretamente na provas de diagnóstico para brucelose, sem a necessidade de métodos adicionais de extração de ácidos nucléicos (Orzil et al. 2016).

O segundo método foi aplicado aos fragmentos dos órgãos macerados e aos suabes com secreções vaginais, anais, de leite ou colostro e com aspirado de linfonodos. Um kit comercial de obtenção de DNA por lavagens em colunas de extração (DNeasy Blood & Tissue Kit, cat. No. 69506, Quiagen®) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante, incluindo uma de incubação inicial a 65 °C / 1 hora dos fragmentos de órgãos em solução de proteinase K (40 µl) com o tampão ATL do próprio kit (360 µl). Este processo garantia também a inativação de *Brucella* spp. No caso dos suabes, as pontas das hastes de coleta foram cortadas como se fossem um fragmento tecidual, procedendo com as demais etapas da extração da mesma forma que com os órgãos.

### **PCR Multiplex**

No Laboratório de Biologia Molecular do LANAGRO-MG, foram utilizados os protocolos de diagnóstico validados para amostras de bovinos. As colônias típicas coletadas foram examinadas por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) *Multiplex* (Orzil et al. 2016), similar ao método AMOS, descrito por Bricker et al. (1994). No mix desta PCR foram incorporados oligonucleotídeos que detectam as diferentes espécies e biovars de *Brucella* spp., incluindo as cepas vacinais (Bricker et al. 1994, López-Goñi et al. 2008) e que indicam a presença de genoma bacteriano, por meio do gene 16S (Bricker et al. 2003). As amostras de DNA para o controle positivo da prova foram obtidas de cultivos de referência do LANAGRO.

As sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados; as concentrações de cada reagente das reações da PCR *Multiplex*; as temperaturas e tempos utilizados em cada estágio da amplificação do DNA; assim como, os tamanhos dos fragmentos amplificados e as espécies e biovars de *Brucella* spp. correspondentes foram descritas por Orzil et al. (2016). Os produtos da PCR foram processados e avaliados em um sistema de análise para fragmentos amplificados por de eletroforese capilar (QIAxcel Advanced System – Qiagen®), conforme as instruções do fabricante.

### **PCR em tempo-real**

O DNA extraído a partir de órgãos e suabes, além daqueles obtidos a partir do cultivo microbiológico, foram submetidos a PCR em tempo-real (qPCR) *IS711.133*, no termociclador *LigthCycler* 480 II (Roche®), conforme a metodologia descrita em Preis et al. (2016). As seguintes sequências de iniciadores foram utilizadas: BruIS711,133.F: GCCCTTAAGTGATCGGCATC; Bru.IS711.133.R: GCCTACCGCTGCGAATAAAG e Bru.IS711.133.S: FAM-TGCCCCACACCCTTCAAGCC-BHQ1, esta última contendo a sonda para luminescência. O conjunto de oligonucleotídeos foi desenhado para detectar o elemento de inserção *711*, presente no genoma de *Brucella* spp. e que gera, quando amplificado, fragmentos com 133 pares de bases (pb).

A técnica foi padronizada e validada a partir do DNA extraído de linfonodos e lesões sugestivas de brucelose em carcaças de bovinos, apresentando sensibilidade diagnóstica de aproximadamente 93% (Preis et al. 2016). A interpretação dos resultados da qPCR *IS711.133* foi baseada na comparação das curvas de amplificação apresentadas pelas amostras de referência com as das amostras testadas, que deveriam estar acima dos pontos de corte para cada rodada de análises.

### **Caracterização de *Brucella* spp.**

#### ***Nested* PCR**

Com a intenção de comprovar os resultados encontrados na qPCR e de produzir fragmentos *Brucella* spp. que pudessem ser sequenciados, foram selecionadas duas amostras positivas para *Brucella* spp. por espécie de animal silvestre. Além, do resultado positivo na qPCR, foram preconizadas as amostras de indivíduos sororreagentes na FPA.

Foram utilizados os iniciadores Bru1ExF CTTCAACCATTTTGGCCATC e Bru1ExR CTTGTCCATCAGGCTTTGCT, que amplificam fragmentos de 469 pb para a *nested* PCR externa, e Bru2InF GCCGCTATTATGTGGACTGG e Bru2InR GATCGTAGTCGTCCGGGTTA, amplificando 363 pb para *Brucella* spp. na *nested* PCR interna (Preis et al. 2016).

Os reagentes, volumes das reações e os programas para o termociclador eram os mesmos para *nested* PCR externa e interna. O *mix* para a reação contém por amostra: 8,7 µl de água ultra-pura, livre de endonucleases; 4 µl de tampão taq 5X; 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/l); 0,4 µl de dNTP (10 mmol/l); 2,0 µl dos oligonucleotídeos Bru1ExF ou Bru2InF (5 pmol/µl), respectivamente, dependendo se a reação fosse externa ou interna; da mesma forma, 1,5 µl do oligonucleotídeo Bru1ExR ou do Bru2InR (5 pmol/µl), respectivamente para *nested* PCR externa ou interna; 0,2 µl de Taq DNA polimerase e 2,0 µl do DNA alvo, que no caso da *nested* PCR interna era sempre o produto da amplificação de uma amostra pela *nested* PCR externa. As temperaturas e ciclos utilizados no termociclador foram as mesmas para *nested* PCR externa e interna: 1 ciclo inicial de 95 °C / 5 minutos; 40 ciclos com temperaturas alternando sucessivamente em 95 °C / 40 segundos, 56 °C / 90 segundos e 72 °C / 40 segundos; um ciclo final a 72 °C / 4 minutos. (Preis et al. 2016).

As etapas para a interpretação dos resultados da *nested* PCR foram executadas conforme descrito para PCR *Multiplex*.

### **Sequenciamento**

As amostras positivas na *nested* PCR foram encaminhadas para o sequenciamento na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte. Foram utilizadas as técnicas convencionais para análise em sequenciador por eletroforese capilar e nos enviaram os arquivos com as sequências de nucleotídeos encontradas. Utilizando os recursos de análise do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), as sequências obtidas foram confrontadas com as armazenadas para a confirmação do DNA detectado nas amostras como sendo de *Brucella* spp.

Na tentativa de identificar as espécies de *Brucella* spp. já confirmadas pelo sequenciamento, foi modificada a PCR *Multiplex* para aumentar a sua sensibilidade de diagnóstico. Conforme orientações da equipe do LANAGRO, as reações para amplificação

foram igualmente preparadas com os pares de nucleotídeos 16S-universal.800 e Bru-BMEii428, além do Bru-AMOS-IS711. Porém foram retiradas da reação as sequências espécie-específicas para *Brucella* spp., excetuando penas a espécie alvo que era buscada. Desta forma, foram conduzidas duas reações em paralelo para cada amostra positiva no sequenciamento, uma utilizando Bru-AMOS-*B. abortus* e outra Bru-AMOS-*B. suis*.

### **Análise dos resultados de diagnóstico**

Somente os resultados de sorologia foram utilizados para as estimativas de positividade da brucelose, uma vez que, apenas nas provas da FPA, 2-ME e AAT, havia amostras suficientes para a inclusão homogênea dos indivíduos nos testes de diagnóstico. Os resultados da FPA, por ser considerada a prova mais sensível e específica utilizada nos soros (GALL et al., 2001, MATHIAS et. al., 2010, OIE, 2015), foram definidos como a base para seleção das amostras com mais chances de detecção de *Brucella* spp., tanto para o cultivo microbiológico como para os testes moleculares.

Para os resultados moleculares de diagnóstico, obtidos a partir de diferentes amostras biológicas, foi feita uma análise descritiva dos dados, apontando as limitações das técnicas utilizadas e alternativas que poderiam ser aplicadas no monitoramento da brucelose em animais silvestres.

### **Autorização ambiental e avaliação bioética**

Este estudo foi aprovado pelo comitê de bioética e experimentação animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) por meio do certificado nº 368 de 14 de outubro de 2011 e da Universidade Federal Fluminense, com o número 571, em 3 de julho de 2014. Por envolver animais silvestres, conta também, com aprovação pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), conforme os documentos Nº 20029-5 e 25317-2 e 35296-6.

## **RESULTADOS**

Na Figura 1. Utilizamos um fluxograma para sintetizar o delineamento do presente estudo com um resumo dos resultados por etapas de trabalho.

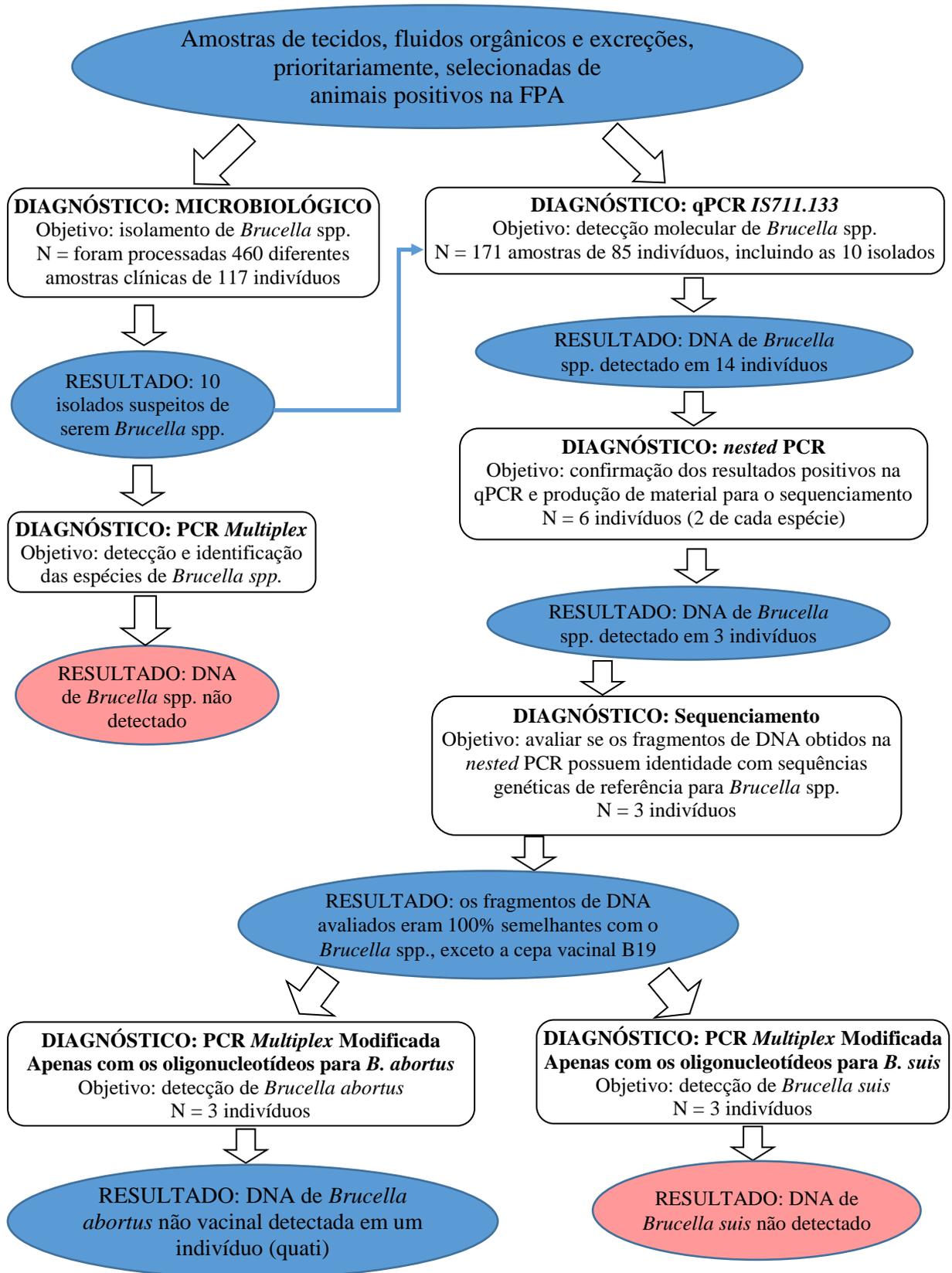


Figura 1. Fluxograma com os métodos de diagnóstico empregados para detecção e identificação de *Brucella* spp., demonstrando os objetivos preconizados e os resultados atingidos em cada etapa deste estudo aplicado às amostras de mamíferos silvestres do Pantanal.

Quadro 1. Número total de indivíduos e seus respectivos resultados nos diferentes testes de diagnóstico e metodologias empregados para identificar animais silvestres com brucelose.

Espécie animal e categorias de diagnóstico	Testes ou metodologias de Diagnóstico										
	FPA <sup>a</sup>	Sorologia		Microbiologia	PCR	qPCR	Provas Moleculares			Sequencia-	PCR <i>Multiplex</i>
		2-ME <sup>b</sup>	AAT <sup>c</sup>	Cultivo bacteriológico <sup>d</sup>	<i>Multiplex</i> <sup>e</sup>	amostras <sup>f</sup>	qPCR colônias <sup>g</sup>	qPCR Total <sup>h</sup>	<i>Nested</i> PCR <sup>i</sup>	mento	modificada <sup>j</sup>
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>											
Positivos	7 (5,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0	0	2	2	4	0	0	0
Negativos	122	130	130	75	6	56	4	60	2	0	0
Total veados	129	130	130	75 (297)	6	58	6	64	2	0	0
<i>Cerdocyon thous</i>											
Positivos	12 (24,0%)	3 (6,0%)	6 (12,0%)	0	0	5	2	7	2	2	0
Negativos	38	47	44	26	4	9	2	11	0	0	2
Total lobinhos	50	50	50	26 (112)	4	14	4	18	2	2	2
<i>Nasua nasua</i>											
Positivos	3 (13,6%)	2 (9,1%)	2 (9,1%)	0	0	3	0	3	1	1	1 <i>B. abortus</i>
Negativos	19	20	20	16	0	0	0	0	1	0	0
Total quatis	22	22	22	16 (51)	0	3	0	3	2	1	1
TOTAL GERAL	201	202	202	117 (460)	10	75	10	85	6	3	3

FPA<sup>a</sup> = Teste de polarização fluorescente (*fluorescent polarization assay*); 2-ME<sup>b</sup> = Prova do 2-mercaptoetanol; AAT<sup>c</sup> = teste do antígeno acidificado; Cultivo microbiológico<sup>d</sup> = o primeiro número representa o total de animais e o número entre parêntesis, o total de amostras que foram examinadas; PCR<sup>e</sup> *Multiplex* = PCR-AMOS, criada pela equipe do Lanagro-MG, descrita na metodologia; qPCR-amostras<sup>f</sup> = reação da cadeia de polimerase em tempo-real qPCR *IS711.133* realizada em DNA extraído diretamente de amostras biológicas; qPCR-colônias<sup>g</sup> = reação da cadeia de polimerase em tempo-real qPCR *IS711.133* aplicada em DNA extraído de colônias isoladas no cultivo microbiológico; qPCR-Total<sup>h</sup> = soma de todas as amostras examinadas pela qPCR *IS711.133*. *Nested* PCR<sup>i</sup> = Resultados da *Nested* PCR, conforme descrito na metodologia. PCR-*Multiplex* modificada<sup>j</sup> = PCR-AMOS criada pela equipe do Lanagro-MG, e executada com os oligonucleotídeos espécie-específicos separadamente. Na tabela, é representado apenas o seu resultado conclusivo: *B. abortus*.

Foram capturados 130 veados-campeiros, 50 lobinhos e 22 quatis. O número total e as taxas de soropositividade encontradas estão descritos no Quadro 1, categorizados por espécie.

Ao todo foram cultivadas 460 amostras de 117 diferentes animais, sendo que em 10 animais foram obtidas colônias com aspecto semelhante a *Brucella* spp. Estas bactérias foram negativas na PCR *Multiplex*, utilizada para a identificação das colônias. Porém, ao submeter as colônias a qPCR *IS711.133*, foi possível detectar DNA de *Brucella* spp. em quatro indivíduos (Quadro 1).

Foi extraído DNA diretamente de 156 amostras biológicas de 75 animais. O material obtido foi submetido a qPCR *IS711.133*, que detectou *Brucella* spp. em 12 amostras distintas (Apêndice B), pertencentes a 10 indivíduos. Somando-se os resultados de qPCR *IS711.133* obtidos a partir de material clínico e de colônias pré-cultivadas, em 14 animais foi detectado DNA de *Brucella* spp. (Quadro 1).

Dentre as seis amostras de DNA selecionadas para a *nested* PCR foi possível obter produtos amplificados em três delas, dois lobinhos e um quati (Quadro 1). Este material foi sequenciado, apresentando 100% de taxa de cobertura (*Query cover*) no alinhamento dos fragmentos analisados, que tinham entre 339 e 354 pb, além de 100% de identidade com o DNA de diversas espécies de *Brucella* spp do *Genbank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Quando os fragmentos sequenciados foram comparados com *Brucella abortus* biovar 1 S19, a taxa de cobertura foi de 66%. E quando confrontados com *Ochrobactrum anthropi* as amostras analisadas tiveram 90% de identidade genética (Apêndice C)

As três amostras positivas para o gênero *Brucella* spp. e sequenciadas foram avaliadas na PCR *Multiplex*, com os oligonucleotídeos espécie-específicos para *Brucella abortus* e *Brucella suis* separados, em reações preparadas em paralelo. Após a amplificação do DNA, foi possível detectar *Brucella abortus* somente na amostra de PAAF de um quati.

## DISCUSSÃO

Quando comparada às provas do AAT e do 2-ME, observa-se que a polarização fluorescente (FPA) indicou as maiores taxas sorológicas para a brucelose nas três espécies de mamíferos silvestres pesquisadas. A maior sensibilidade diagnóstica dessa prova na detecção de anticorpos contra *Brucella* spp. pode ter causado essa variação de resultados (Godfroid et al. 2010).

Observa-se também que os veados-campeiros apresentaram menores taxas de exposição a *Brucella* spp. em comparação com os carnívoros. Não conhecemos os mecanismos de infecção e

resiliência dessa bactéria no veado-campeiro, no entanto, em cervídeos da América do Norte, existe um forte componente ambiental na dinâmica epidemiológica da brucelose. Nos meses de inverno e, conseqüente, escassez de alimentos, surtos têm sido atribuídos a um estado sazonal de deficiência imunológica nutricional (Cross et al. 2007). A aglomeração destes animais nos períodos do ano mais frios, contribuem ainda mais para a disseminação de bactérias no ambiente (Treanor et al. 2015).

No Pantanal, o veado-campeiro forma grupos familiares pequenos que, em geral, possuem menos de uma dezena de indivíduos (Lacerda 2008). A espécie de maior aglomeração nesse ambiente é o gado. Os bovinos talvez possam elevar as taxas de contaminação do ambiente por *Brucella* spp., tanto nos períodos de inundação quando os rebanhos se concentram nas áreas mais altas, como na estiagem, em torno de fontes hídricas e cochos de suplementação mineralo-protéica. O estresse gerado após os períodos de manejo nos rebanhos bovinos pantaneiros (maio e novembro), também poderia contribuir para a elevação das taxas de exposição a *Brucella* spp. Na África, existem indícios de infecção de ruminantes silvestres pelo contato com rebanhos bovinos com altas prevalências para brucelose, em planícies inundáveis (Muma et al. 2011).

Os lobinhos e quatis apresentaram taxas de positividade sorológica bem mais elevadas que o cervídeo deste estudo (Quadro 1). Dorneles et al. (2014) reportaram 13,2% de positividade para *C. thous* e 8,8% para *Nasua nasua*, utilizando a polarização fluorescente como método de diagnóstico. A variação de resultados entre os levantamentos sorológicos pode estar relacionada à amostragem do primeiro estudo que foi restrita a uma propriedade rural que mantém o seu rebanho bovino sob rigoroso manejo sanitário para brucelose.

Carnívoros podem atuar no ambiente como carniceiros oportunistas (Maichak et al. 2009) o que favorece o contato destes animais com as fontes de infecção natural para a brucelose, como fetos abortados e carcaças de animais mortos. *Brucella* spp. podem permanecer no ambiente por até 4 meses em condições adequadas de umidade e temperatura, ou por até 8 meses no interior de material biológico como leite, placenta, feto abortado, urina e fezes (Walker 2003; Brasil 2006).

Em um experimento realizado na Área do Grande *Yellowstone*, nos EUA, foram espalhados fetos de bisão, previamente inoculados com a cepa vacinal *Brucella abortus* RB51 com a intenção de testar a viabilidade e possibilidade de disseminação destas no ambiente. Foi possível recuperar bactérias vivas do solo, vegetação e carcaças parcialmente consumidas por até 81 dias pós-inoculação (Aune et al. 2011). Quatis e lobinhos poderiam tanto se alimentar de carcaças ou fetos

bovinos abortados, como também poderiam estar sujeitos a infecção ambiental por *Brucella* spp. Esta ocorreria a partir dos solos úmidos das baías e vazantes, onde estes carnívoros podem revolver a terra em busca de invertebrados, ou buscar presas como anfíbios (Bianchi et al. 2013).

A ausência de um teste de diagnóstico validado para *C. thous* e *N. nasua* pode interferir nos resultados encontrados. No caso dos carnívoros, a extrapolação de uma prova de diagnóstico a partir da espécie taxonômica mais próxima não é uma opção aceitável, já que no caso da brucelose, o bovino seria a espécie “equivalente”. Para estas situações a OIE (2015) sugere estudos de longo prazo, onde possam ser formados bancos de referência sorológica, juntamente com metodologias de análise *bayesiana*, que visam amparar os resultados obtidos nos diagnósticos com base na experiência clínica ou epidemiológica de técnicos.

A utilização de provas de diagnóstico em paralelo também pode contribuir para uma maior confiabilidade dos resultados, essencialmente quando se baseiam em diferentes princípios de detecção do agente (Godfroid 2002). Utilizamos neste trabalho, testes de diagnóstico que se baseiam na detecção indireta do agente etiológico, por meio da reação com imunoglobulinas responsivas a sensibilização prévia (FPA, 2ME, AAT); e testes de detecção direta do patógeno, pelo cultivo microbiológico ou por meio de técnicas moleculares (PCR *Multiplex*, qPCR, *nested* PCR e sequenciamento genético) capazes de detectar sequências genéticas específicas para a sua caracterização.

A qPCR-*IS711.133*, como método de triagem molecular, foi capaz de detectar DNA de *Brucella* spp. a partir de diferentes tecidos dos mamíferos silvestres.

Em estudos semelhantes a este, uma PCR em tempo-real desenvolvida para detectar o elemento de inserção genética *IS711* de *Brucella* spp., foi aplicada em amostras de linfonodos e placentas de búfalas, sorologicamente positivas para brucelose, sendo possível a detecção do agente em diversas fases da gestação (Sousa et al. 2015a e 2015b). Estes autores encontraram entre 25 e 65% de DNA de *Brucella* spp. presente nos tecidos reprodutivos e em torno de 11% nos linfonodos analisados. Tais resultados foram mais elevados que os nossos, porém, é importante observar que as condições de obtenção, coleta e acondicionamento dos materiais coletados dentro de um frigorífico se aproximam das ideais. As nossas amostras foram obtidas essencialmente de animais vivos coletados *in situ*, situação que limita o acesso aos órgãos de eleição e as concentrações ideais de material para o diagnóstico.

As amostras que foram positivas somente nas provas moleculares, podem estar relacionadas a infecções iniciais nos animais coletados, com bactérias ainda insuficientes para induzir a produção de anticorpos em quantidades detectáveis. Carnívoros têm sido apontados como reguladores da carga infectante de *Brucella* spp. que é necessária para estabelecer um processo etiológico no hospedeiro (Davis et al. 1988). O pH gástrico mais ácido parece ser o principal responsável por restringir a multiplicação da *Brucella* spp. (Percin et al. 2013). Schnurrenberger et al. (1985), encontraram somente um isolado de 44 amostras de tecidos de guaxinins expostos ao gado durante o período das partições, acreditando que esses animais, procionídeos como o quati, possuíam inabilidade como reservatórios para *Brucella* spp.

Experimentos foram realizados em coiotes na América do Norte, onde estes foram infectados por *B. abortus* em diferentes concentrações, sendo mantidos em cativeiro e tendo amostras de fezes, urina e sangue coletadas a fim de avaliar a carga microbiológica eliminada. Eles foram mantidos nos mesmos piquetes que vacas gestantes, e apenas o grupo de coiotes inoculados com cargas bacterianas ( $1,2 \times 10^{11}$  UFC) bem mais elevadas que as naturalmente eliminadas no ambiente, foi capaz de induzir aborto nas vacas. Os demais coiotes, inoculados com  $7 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^8$  e  $1,5 \times 10^{10}$  UFC, não foram capazes de induzir a soropositividade no gado, não sendo possível isolar bactérias destas vacas, que não abortaram (Davis et al. 1988). Os hospedeiros que controlam um agente infeccioso sem propaga-lo são denominados “*Dead-end-hosts*” ou hospedeiros-terminais (Wobeser 2006).

As provas moleculares de diagnóstico possibilitam minimizar interpretações de reações inespecíficas falso-positivas, uma vez que bactérias com componentes imunogênicos semelhantes ao da *Brucella* spp., como a *Yersinia enterocolitica*, não interferem em seus resultados. Schumaker et al. (2010) demonstrou em cervídeos (*Cervus elaphus*) nos EUA, que o uso das técnicas moleculares de diagnóstico evitaram que reações sorológicas cruzadas para *Y. enterocolitica* O:9 fossem atribuídas à *B. abortus*.

As sorologias aplicadas previamente ao diagnóstico molecular neste estudo, mitigam as chances da detecção do DNA de *Brucella* spp. serem atribuídos ao *Ochrobactrum anthropi* ou *Ochrobactrum intermedium*. Estas bactérias tendem a ser confundidoras do diagnóstico molecular da brucelose, devido ao alto grau de parentesco genético que possuem (Scholz et al. 2008). O sequenciamento realizado, confirmou os maiores percentuais de identidade genética com *Brucella*

spp. (100%), enquanto que para *Ochrobactrum* spp. foi obtida 90% de identidade genética entre as bases analisadas.

Apenas a presença de imunoglobulinas, ou a detecção do DNA do patógeno, não caracterizam uma doença. Esta só ocorre, quando são considerados os aspectos clínico-epidemiológicos aos quais as populações estudadas estão expostas e se essa exposição é, de fato, relevante (Smith e Slenning 2000).

Uma vantagem reportada para as técnicas de diagnóstico para a brucelose que se baseiam na PCR é a possibilidade de detecção do DNA em múltiplos fluidos e tecidos orgânicos (Heinemann et al. 2000; Richtzenhain et al. 2002; Miyashiro et al. 2007). Esta aplicabilidade nos propiciou analisar leite, fezes, secreções corporais, aspirados de linfonodos e até mesmo órgãos coletados de animais mortos.

Dois amostras de cada mamífero silvestre, com diagnóstico positivo para *Brucella* spp. na FPA e na qPCR *IS711.133*, foram selecionadas na tentativa de caracterizar a espécie e cepas de ocorrência no Pantanal. A *nested* PCR complementou a alta sensibilidade diagnóstica da qPCR *IS711.133*, com sua característica maior especificidade em detectar *Brucella* sp. (Preis et al. 2016), além de possibilitar o sequenciamento a partir do seu produto amplificado. As pequenas concentrações de DNA, obtidas a partir de amostras clínicas, puderam ser amplificadas para que fossem sequenciadas.

Na análise de sequenciamento foi descartada a possibilidade de infecção dos animais examinados por *Brucella abortus* biovar 1 B19, bactéria viva presente nas vacinas comercializadas para o gado na região pantaneira. Os três fragmentos de DNA sequenciados tiveram apenas 66% de suas sequências semelhantes a de *B. abortus* B19, enquanto que para outras *Brucella* spp. depositadas no *Genbank*, a semelhança foi de 100%.

A PCR *Multiplex* com os oligonucleotídeos espécie-específicos para *B. abortus* e *B. suis* utilizados em reações separadas, identificou DNA de *Brucella abortus* na amostra de punção de linfonodo poplíteo de quati (*Nasua nasua*). Não foram testados os oligonucleotídeos para *B. melitensis* porque esta não ocorre no Brasil e nem para *B. ovis* por esta ser uma cepa rugosa, que não teria sido identificada como positiva nas provas sorológicas utilizadas (Brasil 2006, OIE 2015).

Este estudo demonstrou que *Brucella* spp. lisas e não vacinais estão presentes no veado-campeiro, lobinho e quati que convivem com bovinos no Pantanal. Foi possível caracterizar exposição e infecção por meio do diagnóstico sorológico e molecular, respectivamente.

Entre os casos positivos, o DNA de *Brucella abortus* foi identificado a partir de um aspirado de linfonodo. Esse método de obtenção de amostras foi proposto por este trabalho, visando o diagnóstico da brucelose em animais vivos. A PAAF teve a sua funcionalidade comprovada por meio das técnicas moleculares de diagnóstico, sendo uma alternativa a mais para a vigilância da brucelose em animais silvestres.

**Agradecimentos.-** Ao professor Luis Antonio Mathias do departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FCAV, Unesp, Jaboticabal, por ceder o seu laboratório e equipamentos para a realização dos testes de polarização fluorescente. A toda equipe de funcionários e colaboradores do LANAGRO-MG, em nome dos fiscais agropecuários Pedro Mota, Paulo Martins, Patrícia Souza e Antônio Fonseca, por terem fornecido treinamento e cedido laboratórios e equipamentos para a realização do diagnóstico microbiológico e molecular de brucelose. Aos funcionários da Embrapa Pantanal e proprietários rurais que compreenderam a importância e colaboraram com este estudo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul pelo financiamento deste projeto.

#### LITERATURA CITADA

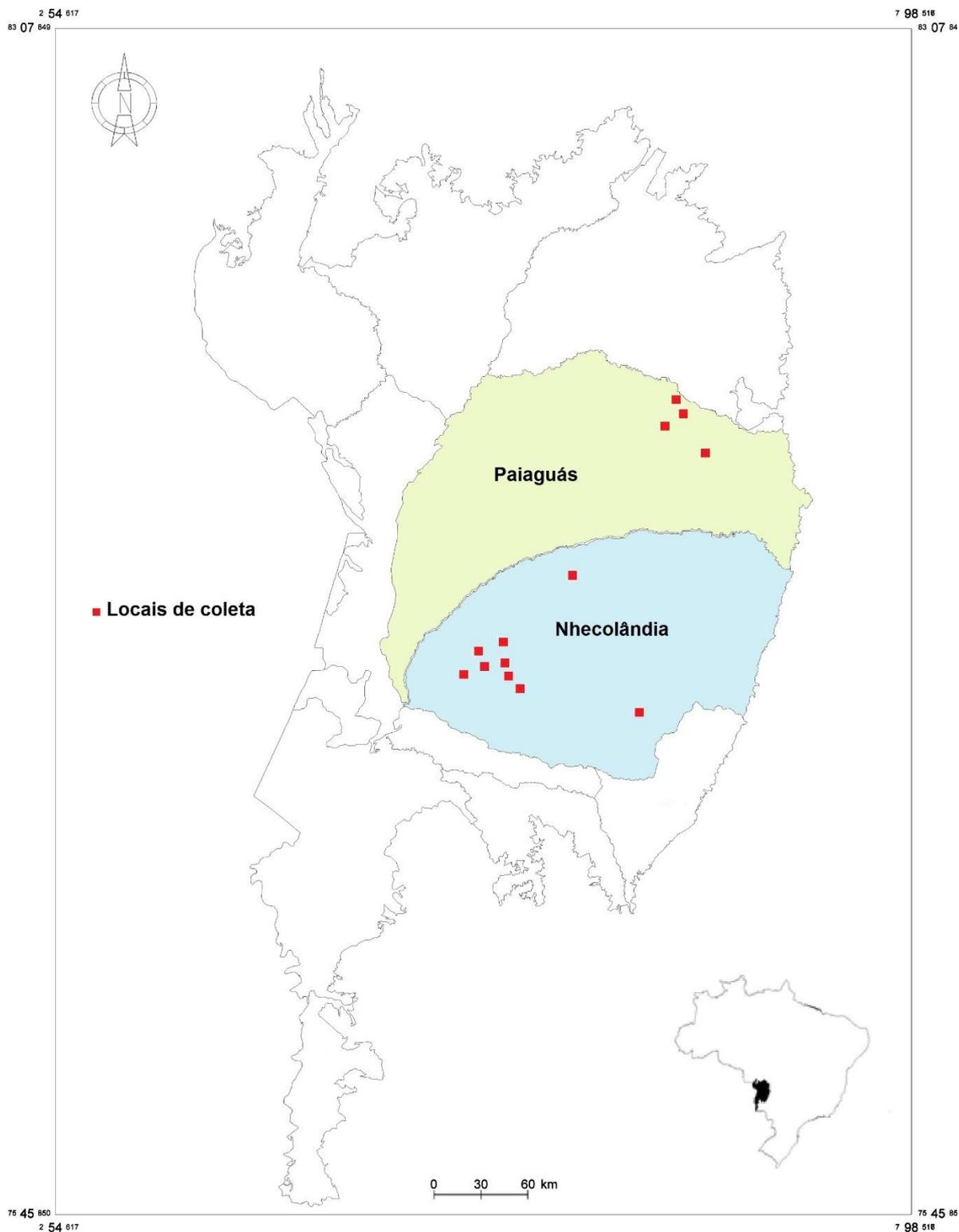
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 190p.
- Aune, K., Rhyan, J. C., Russell, R., Roffe, T. J. and Corso, B. (2012), Environmental persistence of *Brucella abortus* in the Greater Yellowstone Area. *The Journal of Wildlife Management*, 76: 253–261. doi: 10.1002/jwmg.274
- Bianchi, R.C., Campos R.C., Xavier-Filho NL, Olifiers N, Gompper ME, Mourao G (2013) Intraspecific, interspecific, and seasonal differences in the diet of three mid-sized carnivores in a large Neotropical wetland. *Acta Theriol* 59:13–23
- Brasil 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 192p.
- Bricker B.J., Halling S.M. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv.1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:2660-2666.
- Bricker B., Ewalt D., Olsen S. e Jensen A. 2003. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 15:374–378.

- Cheville N. F. e McCullough D. R. 1998. Brucellosis in the Greater Yellowstone Area, National Research Council, Washington DC, 207p.
- Cross P.C., Edwards W.H., Scurlock B.M., Maichak E.J., Rogerson J.D. 2007. Effects of management and climate on elk brucellosis in the Greater Yellowstone Ecosystem. *Ecol Appl.* 17(4):957-64.
- Davis DS, Heck FC, Williams JD, Simpson TR, Adams LG. Interspecific transmission of *Brucella abortus* from experimentally infected coyotes (*Canis latrans*) to parturient cattle. *J Wildl Dis.* 1988 Jul;24(3):533-7.
- Dorneles, E.M.S., Pellegrin, A.O., Schabib Péres, I.A.H.F., Mathias, L.A., Muorão, G., Bianchi, R.C., Olifiers, N., Rocha, F.L., & Lage, A. P. 2014. Serology for brucellosis in free-ranging crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and brown-nosed coatis (*Nasua nasua*) from Brazilian Pantanal. *Cienc. Rural, Santa Maria*, v. 44, n. 12, p. 2193-2196, Dec. 2014.
- Elisei C., Pellegrin A., Tomas W.M., Soares C.O., Araújo F.R., Funes-Huacca M.E., Rosinha G.M.S. 2010. Evidência molecular de *Brucella* spp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(6):503-509.
- Gall, D., N., K., Forbes L., Cook W., Leclair D., Balsevicius S., Kelly L., Smith P. e Mallory M. 2001. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *Journal of Wildlife Diseases, Wildlife Disease Association* 37(1), pp. 110–118.
- Godfroid J, DeBolle X, Roop RM, O'Callaghan D, Tsolis RM, Baldwin C, Santos RL, McGiven J, Olsen S, Nymo IH, Larsen A, Al Dahouk S, Letesson JJ. The quest for a true One Health perspective of brucellosis. *Rev Sci Tech.* 2014 33(2):521-38.
- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J.* 2010 Aug;51(4):296-305. Review. PubMed PMID: 20718082;
- Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties.* 21(1):277-286.
- Heinemann, M.B., Garcia, J.F., Nunes, C.M., Gregori, F., Higa, Z.M.M., Vasconcellos, S.A., Richtzenhain, L.J., 2000. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology* 73, 261–267.
- Lacerda A.C.R. 2008 Ecologia e estrutura social do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal [tese] Brasília (DF): UnB, Tese de Doutorado; 194p.
- Lopez-Goñi I., Garcia-Yoldi D., Marin C. M., De Miguel M. J., Munoz P. M., Blasco J. M., Jacques I, Grayon M., Cloeckert A., Ferreira A.C., Cardoso R., Corrêa de Sá M.I., Walravens K., Albert D. & Garin-Bastuji b. 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology.* 46(10):3484-3487.
- Maichak E. J., Scurlock B. M., Rogerson J. D., Meadows L. L., Barbknecht A. E., Edwards W. H., & Cross P. C. 2009. Effects of management, behavior, and scavenging on risk of brucellosis transmission in elk of western Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases.* 45(2):398-410.

- Maichak, E. J. M., Brandon, Curlock, Jared D. Rogerson, Laura L. Meadows, Andrea E. Barbknecht, William H. Edwards, and Paul C. CrossSource: Journal of Wildlife Diseases, 45(2):398-410. Published By: Wildlife Disease Association DOI: <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.398>Percin D. Microbiology of *Brucella*. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2013; 8(1):13-7.
- Mathias L.A., Girio R.J.S. & Duarte J.M.B. 1999. Serosurvey For Antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. Journal of Wildlife Diseases. 35(1):112-114.
- Mathias, L.A. et al . Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Cienc. Rural, Santa Maria , v. 40, n. 10, p. 2135-2140, Oct. 2010
- Merino, M. L., Gonzales, S., Leeuwenberg, F. Rodrigues, F.H.G., Pinder, L. e Tomas, W.M. 1997. Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. Jaboticabal. FUNEP. pp. 42-58.
- Miyashiro S., Scarcelli E., Piatti R., Campos F., Vialta A., Keid L., Dias R., Genovez M. 2007 Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR). Brazilian Journal of Microbiology 38:17-22.
- Mourão, G., Coutinho M., Mauro R., Campos Z., Tomás W., Magnusson W. 2000. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brasil. *Biol Cons* 92:175-183.
- Muma, J.B., Munyeme M., Matope G., Siamudaala V.M., Munangádu HM, Matandiko W, Godfroid J, Skjerve E, Tryland M. 2011. *Brucella* seroprevalence of the Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) and Black lechwe (*Kobus leche smithemani*): Exposure associated to contact with cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 100:256-260.
- OIE , 2015 World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Chapter 3.6.7 Principles and methods for the validation of diagnostic tests for infectious diseases applicable to wildlife. (Version adopted in May 2014). Disponível em: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>
- Orzil L.L., Preis I.S., Almeida I.G., Souza P.G., Soares Filho P.M., Jacinto F.B. & Fonseca Júnior A.A. 2016. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp. 2016. Ciência Rural. *No prelo*.
- Pellegrin A.O., Leite R. de M.H.; Sereno J.R.B.; Lage A.P.; Leite R.C.; Ravaglia E. 2006. Brucelose bovina no Pantanal Sul-Matogrossense: dados preliminares. Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico. 4p.
- Preis I.S. Souza N.M., Souza P.G., Faria, G.C., Soares Filho P.M., Fonseca Júnior A.A. 2016. Validation three real time PCR and Nested PCR for diagnosis of brucellosis in cattle. Trabalho desenvolvido no Laboratorio Nacional Agropecuário, LANAGRO. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Pedro Leopoldo, 2016. Não Publicado.

- Rhyan J.C., Nol .P, Quance C, Gertonson A, Belfrage J, Harris L, Straka K, Robbe-Austerman S. Transmission of brucellosis from elk to cattle and bison, Greater Yellowstone area, U.S.A., 2002-2012. *Emerg Infect Dis.* 2013 Dec;19(12):1992-5. doi: 10.3201/eid1912.130167.
- Richtzenhain L., Cortez A., Heinemann M., Soares R., Sakamoto S., Vasconcellos S., Z. Higa, E. Scarcelli, M. Genovez. 2002 A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp.and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Veterinary Microbiology* 87 139–147
- Santos S.A. 2002. Aspectos Agro e Zoológicos. *In: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) pp 14-17.*
- Schabib-Péres, I.A.H.F. 2010 Ocorrência de *Brucella* spp. e *Leptospira interrogans* e variáveis de risco associadas às taxas reprodutivas do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Sudoeste da Nhecolândia, Corumbá, MS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 87p.
- Schnurrenberger PR, Brown RR, Hill EP, Scanlan CM, Altieri JA, Wykoff JT. *Brucella abortus* in wildlife on selected cattle farms in Alabama. *J Wildl Dis.* 1985 Apr;21(2):132-6.
- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S.,
- Schumaker BA, Corso BA, Rhyan JC, Philo LM, Salman MD, Gardner IA. Evaluation of the fluorescence polarization assay for the detection of *Brucella abortus* antibodies in bison in a natural setting. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2010 Dec;33(6):e119-25.
- Silva, J.S.V., Abdon, M.M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* v.33, Número Especial, p.1703-1711, out. 1998.
- Smith RD, Slenning BD. Decision analysis: dealing with uncertainty in diagnostic testing. *Prev Vet Med.* 2000 May 30;45(1-2):139-62.
- Sousa, M.G.S. et al. Detecção de *Brucella abortus* em linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) em diferentes fases da gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, [S.l.], v. 35, n. 12, p. 951-955, 2016. ISSN 0100-736X.
- Sousa, M.G.S. et al. Infecção transplacentária e intrauterina por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 11, p. 882-888, 2015.
- Treanor, J.J. et al. Maintenance of brucellosis in Yellowstone bison: linking seasonal food resources, host–pathogen interaction, and life-history trade-offs. *Ecology and evolution*, v. 5, n. 17, p. 3783-3799, 2015. doi: 10.1002/ece3.1633.
- USDA. 2012. Gray Wolf Damage Management in Montana for the Protection of Livestock, Other Domestic Animals, Human Safety, and Other Resources. 112p.
- Walker, R.L. 2003. *Brucella*. *In: Microbiologia Veterinária.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 185-191.
- Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, Nöckler H.J.K., 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 375–382.
- Wobeser, G. A. 2006. *Essentials of Disease in Wild Animals.* Blackwell Publishing, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 243p.

**APÊNDICES**



APÊNDICE A. Representação espacial da localização das 13 propriedades amostradas que contemplaram o ARTIGO 2 desta tese.

APÊNDICE B. Frequência de detecção do DNA de *Brucella* spp. por qPCR *IS711.133*<sup>1</sup> em diferentes tipos de amostras de três espécies de mamíferos silvestres do Pantanal Sul-mato-grossense.

Método de obtenção da amostra	Amostra avaliada <sup>2</sup>	Hospedeiro Silvestre		
		<i>Cerdocyon thous</i> Positivos (total)	<i>Nasua nasua</i> Positivos (total)	<i>Ozotoceros bezoarticus</i> Positivos (total)
Suabe com meio de Stuart <sup>3</sup>	Secreção Vaginal	0 (8)	1 (2)	0 (44)
	Fezes da ampola retal	2 (12)	0 (3)	0 (5)
	Leite ou Colostro	1 (1)		0 (18)
Suabe seco <sup>4</sup> bacteriológico	Secreção Vaginal	0 (2)	0 (1)	
	Fezes da ampola retal	1 (2)	0 (1)	
	Leite ou Colostro	0 (1)		
PAAF <sup>5</sup> + Suabe com meio de Stuart	Parênquima de linfonodos superficiais	1 (12)	0 (2)	1 (17)
PAAF + Suabe seco bacteriológico	Parênquima de linfonodos superficiais	0 (2)	1 (2)	0 (3)
Necropsia <sup>6</sup>	Fígado			1 (2)
	Rins	0 (1)	0 (1)	1 (2)
	Baço em meio de Farrell	0 (1)	1 (1)	0 (2)
	Linf. Cerv. Superficial <sup>7</sup>	0 (1)		
	Linf. poplíteo	0 (1)	0 (1)	
	Pulmões (fetais)			1 (2)
	Estômago (fetal)			0 (1)
	Útero			0 (1)
	Placenta			0 (1)
Colônias cultivadas a partir de:	Muco vaginal			1 (1)
	Suabe Stuart embebido em leite/colostro			0 (2)
	Suabe Stuart com material da ampola retal	2 (4)		1 (2)
	Baço em meio de Farrell <sup>8</sup>	0 (1)		
	Linf. Cerv. Superf.			1 (1)
	Linf. Cerv. Superf. em meio de Farrell	0 (1)		
	Linf. Pop. em meio Farrell	0 (1)		
	Rim	0 (1)		
Rim em meio de Farrell	0 (1)			
<b>TOTAL GERAL</b>	<b>AMOSTRAS / ESPÉCIE</b>	<b>7 (53)</b>	<b>3 (14)</b>	<b>7 (104)</b>

qPCR<sup>1</sup>*IS711.133* = reação de cadeia de polimerase em tempo real; Amostra avaliada<sup>2</sup> = amostra clínica ou colônia cultivada, da qual foi extraído o DNA; Stuart<sup>3</sup> = meio de cultura comercial próprio para transporte de amostras destinadas ao cultivo bacteriológico; Suabe seco<sup>4</sup> = suabe bacteriológico simples, sem meio de cultura; PAAF<sup>5</sup> = punção aspirativa com agulha fina; Necropsia<sup>6</sup> = as necropsias foram realizadas oportunamente; Linf. Cerv. Superficial<sup>7</sup> = linfonodo cervical superficial; Farrell<sup>8</sup> = suplemento comercial para meios de cultura seletivo para *Brucella* spp.

Brucella abortus 104M chromosome 2, complete sequence  
Sequence ID: [gb|CP009626.1](#) Length: 1162580 Number of Matches: 1

Range 1: 515324 to 515662 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
627 bits(339)	6e-176	339/339(100%)	0/339(0%)	Plus/Minus
Query 1	TGGACTGGTTCAAGACCTTTGCCGATATTTCGGCGATCTTGGCGCAAGTCCGTCGGTA	60		
Sbjct 515662	TGGACTGGTTCAAGACCTTTGCCGATATTATCGGCGATCTTGGCGCAAGTCCGTCGGTA	515662		
Query 61	CGCAGTTTGAATCTTCACTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCCGCGAAGAACTTA	120		
Sbjct 515602	CGCAGTTTGAATCTTCACTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCCGCGAAGAACTTA	515542		
Query 121	TCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCGAGGTGGCCGAACATGCGGCAAGTGCGGGCTCG	180		
Sbjct 515542	TCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCGAGGTGGCCGAACATGCGGCAAGTGCGGGCTCG	515482		
Query 181	ACTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGCAATTTGGCGAGACGATTGCCGAAT	240		
Sbjct 515482	ACTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGCAATTTGGCGAGACGATTGCCGAAT	515422		
Query 241	GCATGAAGCTTCAGGATCGGCTCACCGCCCTAACATGGCGATCCCCATGTGGATGATGG	300		
Sbjct 515422	GCATGAAGCTTCAGGATCGGCTCACCGCCCTAACATGGCGATCCCCATGTGGATGATGG	515362		
Query 301	CCGATATCGACCATGGTGACGTGACATCCGCTAACCCGG	339		
Sbjct 515362	CCGATATCGACCATGGTGACGTGACATCCGCTAACCCGG	515324		

**Exemplo 1.**  
*Brucella spp.* do quali x *Brucella abortus* 104M do genbank  
**100% de cobertura dos 339 pb**  
**100% de alinhamento**  
**Sequenciamento ideal**

Ochrobactrum anthropi strain OAB chromosome 2, complete sequence  
Sequence ID: [gb|CP008819.1](#) Length: 1930134 Number of Matches: 1

Range 1: 1044697 to 1045033 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
435 bits(235)	4e-118	304/338(90%)	2/338(0%)	Plus/Plus
Query 3	GACTGGTTCAAGACCTTTGCCGATATTTCGGCGATCTTGGCGCAAGTCCGTCGGTACG	62		
Sbjct 1044697	GACTGGTTCAAGACCTTTGCCGACATTATCGGCGATCTTGGCGCAAGTCCGTCGGTACG	1044756		
Query 63	CAGTTTGAATCTTCACTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCCGCGAAGAACTTA	122		
Sbjct 1044757	CAGTTTGCATCTTCACTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCCGCGAAGAACTTA	1044816		
Query 123	AAGATCGCCATCGACTGCTGGGCGAGGTGGCCGAACATGCG-GCAGGTGCGGGCTCGA	181		
Sbjct 1044817	AAGATCGCCATCGACTGCTGGGCGAAGTGCGCCGAACATGCGGAGC-CGTGCCGCTCGA	1044875		
Query 182	CTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGCAATTTGGCGAGACGATTGCCGAATG	241		
Sbjct 1044876	CTATGTGTTCTGGGAACCGATGAGCATCGGGCGTGAATTTGGCGAGACGATTGCCGAATG	1044935		
Query 242	CATGAAGCTTCAGGATCGGCTCACCGCCCTAACATGGCGATCCCCATGTGGATGATGGC	301		
Sbjct 1044936	CATGAAGCTTCAGGATCGCCTGACCGCCCGGCGATGGCTATCCGATGTGGATGATGGC	1044995		
Query 302	CGATATCGACCATGGTGACGTGACATCCGCTAACCCGG	339		
Sbjct 1044996	CGATATCGACACGGGATGTGACGTCCGCCAATCCGG	1045033		

**Exemplo 2.**  
*Brucella spp.* do quali x *Ochrobactrum anthropi strain OAB* do genbank  
**98% de cobertura dos 339 pb**  
**90% de alinhamento**  
**apresentou muitas bases diferentes**

Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence  
Sequence ID: [gb|CP000888.1](#) Length: 1161449 Number of Matches: 1

Range 1: 364213 to 364439 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
420 bits(227)	1e-113	227/227(100%)	0/227(0%)	Plus/Minus
Query 1	TGGACTGGTTCAAGACCTTTGCCGATATTTCGGCGATCTTGGCGCAAGTCCGTCGGTA	60		
Sbjct 364439	TGGACTGGTTCAAGACCTTTGCCGATATTATCGGCGATCTTGGCGCAAGTCCGTCGGTA	364380		
Query 61	CGCAGTTTGAATCTTCACTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCCGCGAAGAACTTA	120		
Sbjct 364379	CGCAGTTTGAATCTTCACTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCCGCGAAGAACTTA	364320		
Query 121	TCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCGAGGTGGCCGAACATGCGGCAAGTGCGGGCTCG	180		
Sbjct 364319	TCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCGAGGTGGCCGAACATGCGGCAAGTGCGGGCTCG	364260		
Query 181	ACTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGCAATTTGGCGAG	227		
Sbjct 364259	ACTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGCAATTTGGCGAG	364213		

**Exemplo 3.**  
*Brucella spp.* do quali x *Brucella abortus* S19 (vacinal) do genbank  
**66% de cobertura dos pares de bases**  
**100% de alinhamento**  
**Apesar de um ótimo alinhamento, não existem 34% dos pares de base sequenciados na nossa amostra quando comparadas a *B. abortus* S19**

Apêndice C. Comparação de três alinhamentos de pares de base obtidos na análise pelo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). No primeiro exemplo o alinhamento foi perfeito (100%) entre a amostra analisada e uma *Brucella spp.* de referência do genbank. No segundo, a bactéria *O. anthropi* incriminada por produzir reações falso-positivas no diagnóstico molecular para a brucelose apresentou menor identidade genética com o nosso fragmento de DNA em relação as *Brucella spp.* depositadas no *genbank*. No último exemplo, a cepa vacinal *B. abortus* S19 (B19, em português) foi 100% idêntica a nossa amostra, pois também é uma *Brucella spp.* Porém no seu DNA apresenta uma deleção de 34% pares de base no segmento analisado. O que permitiu a distância entre a nossa amostra e esta cepa vacinal.

ANEXO 1. Referente aos dados do Artigo 2: Comparativo dos resultados obtidos na prova sorológica da FPA e na molecular da qPCR *IS711*, utilizadas como referências para triagem neste estudo.

ESPÉCIE	INDIVÍDUOS	FPA	qPCR <i>IS711</i>
<i>Cerdocyon thous</i>	1	POSITIVO	NEGATIVO
	2	POSITIVO	NEGATIVO
	3	NEGATIVO	POSITIVO
	4	POSITIVO	NEGATIVO
	5	POSITIVO	NEGATIVO
	6	POSITIVO	NEGATIVO
	7	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
	8	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
	9	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
	10	POSITIVO	NEGATIVO
	11	NEGATIVO	POSITIVO
<i>Nasua nasua</i>	1	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
	2	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
	3	POSITIVO	NEGATIVO
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	1	POSITIVO	NEGATIVO
	2	POSITIVO	NEGATIVO
	3	POSITIVO	NEGATIVO
	4	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
	5	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
	6	POSITIVO	NEGATIVO
	7	NEGATIVO	POSITIVO
	8	NEGATIVO	POSITIVO

ANEXO 2. Referente aos dados do Artigo 2: Lista de oligonucleotídeos e, respectivas, sequências de bases utilizados na PCR-AMOS-LANAGRO

Denominação dos oligonucleotídeos	Sequência de bases componentes
Bru-AMOS- <i>B. abortus</i>	GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC
Bru-AMOS- <i>B. melitensis</i>	AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA
Bru-AMOS- <i>B. ovis</i>	CGG GTT CTG GCA CCA TCG
Bru-AMOS- <i>B. suis</i>	GCG CGG TTT TCT GAA GGT TCA GG
Bru-AMOS-IS711	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT TGC CAG
16s-Universal.800F	GTG CCA GCA GCC GTA ATA C
16s-Universal.800R	TGG TGT GAC GGG CGG TGT GTA CAA G
Bru-BMEii0428F	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG
Bru-BMEii0428R	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG

Anexo 3. Referente ao Artigo 2: Detalhamento das metodologias empregadas nas PCR *Multiplex* e qPCR *IS711.133*.

### **PCR *Multiplex* (AMOS-LANAGRO)**

A cada amostra a ser avaliada, a solução da PCR-AMOS-LANAGRO utiliza 8,5 µl de água ultra-pura ou tratada com DPEC<sup>1</sup>; 5 µl de Tampão taq 5X, 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/l); 0,6 µl de dNTP<sup>2</sup> 10 mmol/l (lista de abreviações); 1 µl de cada oligonucleotideo (5 pmol/µl) IS711, Bru-AMOS-*B. abortus*, Bru-AMOS-*B. mellitensis*, Bru-AMOS-*B. ovis* e Bru-AMOS-*B. suis*; 0,5 µl de cada oligonucleotideo (5 pmol/µl) Bru-BMEii428F, Bru-BMEii428R, 16S-universal-800F e 16S-universal-800R; 0,2 µl de Taq DNA e 2,5 µl do DNA alvo que se quer amplificar, totalizando 25 µl por reação. Os estágios de termociclagem foram de um ciclo de 95 °C / 3 minutos para a desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de 95 °C / 75 segundos para desnaturação, 55.5 °C / 80 segundos para anelamento e 72 °C / 80 segundos para extensão e, um último ciclo de 72 °C / 5 minutos para extensão final.

### **qPCR *IS711.133***

A solução de amplificação continha: 2.9 µl de água ultra-pura; 12,5 µl do MIX para qPCR (QuantiFast, Quiagen, Alemanha); 2 µl dos oligonucleotideos Bru.IS711.133F e Bru.IS711.133R (ambos, em concentração de 5 pmol/L); 1 µl de Bru.IS711.133S (5 pmol/L); 0,6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 nM) e 2,5 µl do DNA alvo, totalizando 25 µl de volume total. As reações foram preparadas em placas de 96 poços próprias para o equipamento de qPCR LightCycler 480 (Roche®), no qual programamos os estágios do diagnóstico: inicialmente um ciclo com temperatura de 50 °C / 2 minutos; depois, outro ciclo único com temperatura de 95 °C durante 15 segundos e; por último, 45 ciclos alternando temperaturas de 95 °C / 15 segundos e 60 °C / 60 segundos.