

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

**EVIDENCIA EPIDEMIOLÓGICA DE *Brucella* sp em
BOVINOS E VEADOS-CAMPEIROS (*Ozotoceros
bezoarticus*) EM SIMPATRIA NO PANTANAL DE MATO
GROSSO DO SUL**

***EPIDEMIOLOGICAL EVIDENCE OF *Brucella* sp IN
CATTLE AND PAMPAS DEER (*Ozotoceros bezoarticus*) IN
SYMPATRY ON PANTANAL OF MATO GROSSO DO SUL***

Namor Pinheiro Zimmermann

**CAMPO GRANDE - MS
2012**

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

**EVIDENCIA EPIDEMIOLÓGICA de *Brucella sp* em
BOVINOS E VEADOS-CAMPEIROS (*Ozotoceros
bezoarticus*) EM SIMPATRIA NO PANTANAL DE MATO
GROSSO DO SUL**

***EPIDEMIOLOGICAL EVIDENCE OF *Brucella sp* IN
CATTLE AND PAMPAS DEER (*Ozotoceros bezoarticus*) IN
SYMPATRY ON PANTANAL OF MATO GROSSO DO SUL***

Namor Pinheiro Zimmermann

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Aiesca Oliveira Pellegrin

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Grácia Maria Soares Rosinha

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

CAMPO GRANDE, MS - 1012

Namor Pinheiro Zimmerman

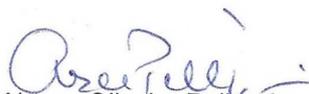
“Evidencia Epidemiológica de *Brucella* sp em bovinos e veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) em simpatria no Pantanal de Mato Grosso do Sul”

“Epidemiologic evidence of *Brucella* sp in cattle and pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in sympatry on Pantanal of Mato Grosso do Sul

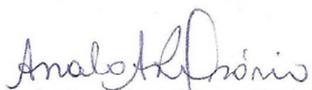
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

APROVADO: 01/03/2012

Área concentração: Sanidade Animal



Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin
Orientadora



Dra. Ana Luisa Alves Rosa Osório



Dra. Carina Elisei de Oliveira

"A ambição da ciência não é abrir a porta do saber infinito, mas pôr um limite ao erro infinito."

Bertold Brecht (1898-1956)

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e em especial a Fabiana, pelo incentivo e encorajamento.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constante.

À minha orientadora, Professora Doutora Aiesca Oliveira Pellegrin pelo ensinamento e dedicação.

Agradeço em especial ao Igor que sempre é um companheiro para todas as horas.

Ao pessoal da EMBRAPA, principalmente o Laboratório de Engenharia Genética que são prestativos e sempre alegres em todos os momentos.

A Renata Bastos, Mônica Custodio, Nadia Lopes, Irene Elisei, Cleber Galvão, Aline Gonçalves, Patrícia Melo, Thiago Dutra, Isabella Blecha, Cristiane Sanches, Marrielen Aparecida, Rosielle de Pinho.

A todos os professores pelo conhecimento e aprendizado.

Ao programa de Mestrado em Ciência Animal da UFMS pela oportunidade. E lógico a Marilete Otaño, sempre tão paciente.

Aos animais, que com muito respeito auxiliaram neste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Etiologia.....	4
1.2 Epidemiologia.....	5
1.3 Transmissão.....	7
1.4 Patogenia.....	8
1.5 Interface da transmissão de <i>Brucella</i> sp. entre animais domésticos e silvestres.....	10
1.6 Diagnóstico.....	11
1.6.1 Diagnóstico Direto.....	12
1.6.2 Diagnóstico Indireto.....	14
REFERÊNCIAS.....	17
ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
ANEXO.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Resultados comparativos dos testes 2-ME e PCR na detecção de *Brucella* ssp. em veados-campeiros de uma região da Nhecolândia, Pantanal de Mato Grosso do Sul.....35

Tabela II - Resultados comparativos dos testes 2-ME e PCR na detecção de *Brucella* ssp. em bovinos de uma região da Nhecolândia, Pantanal de Mato Grosso do Sul.....35

RESUMO

A brucelose é uma zoonose de grande importância mundial, pois além de afetar a saúde dos humanos, o aborto provocado pela infecção causa sérios prejuízos econômicos aos animais de produção, e representa um risco à biodiversidade em se tratando de mamíferos silvestres. Os testes sorológicos são utilizados na rotina para a identificação de animais expostos ao agente infeccioso. Adicionalmente, o diagnóstico molecular é uma ferramenta empregada na detecção e estudos epidemiológicos da brucelose. O objetivo deste trabalho foi investigar e comparar a ocorrência de *Brucella* sp. em veados-campeiros e bovinos em simpatria na sub-região Pantaneira da Nhecolândia, município de Corumbá/MS. O sangue total com e sem anticoagulante foi coletado de 59 veados-campeiros e 132 bovinos. A PCR foi realizada utilizando-se iniciadores gênero-específicos direcionados ao gene BCSP31 de *Brucella* sp. Os soros positivos ao teste do AAT foram confirmados pelo teste do 2-ME. Dentre os cervídeos, três animais foram positivos para na PCR e dois no 2-ME. Nos bovinos, 20 indivíduos foram positivos na PCR e 25 no 2-ME. Os resultados do presente trabalho sugerem que a *Brucella* spp. circula no ambiente do Pantanal Sul-Mato-Grossense entre os veados-campeiros e bovinos em simpatria.

Palavras-chave: brucelose – cervídeos – bovinos – Pantanal - PCR - sorologia.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease of global importance, as besides affect the health of humans, abortion caused by the infection causes serious economic losses to livestock, and represents a risk to biodiversity when it comes to wild mammals. Serological tests are routinely used for identification of animals exposed to the infectious agent. Additionally, the molecular diagnosis is a tool employed in the detection of brucellosis and epidemiological studies. The aim of this study was to investigate and compare the occurrence of *Brucella* spp. in pampas deer and cattle in sympatry in the subregion Pantaneira of Nhecolândia, Municipality of Corumbá / MS. The whole blood with and without anticoagulant was collected from 59 pampas deer and 132 cattle. PCR was performed using primers directed to the genus-specific gene BCSP31 from *Brucella* sp. Serum samples positive by AAT test were confirmed by 2-ME test. Among the deer, three animals were positive in PCR and two in the 2-ME test. In cattle, 20 individuals were positive by PCR and 25 in 2-ME test. The results of this study suggest that the *Brucella* spp. circulates in the environment of the Pantanal of Mato Grosso do Sul state between pampas deer and cattle in sympatry.

Keywords: Brucellosis - deer - cattle - Pantanal - PCR – serology

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa importante na saúde pública transmitida dos reservatórios animais para os humanos (Godfroid et al., 2005). Animais selvagens e domésticos contribuem para a manutenção desta zoonose nos ambientes naturais. A vigilância e o monitoramento do status da sanidade é estritamente regular nos animais domésticos, e o monitoramento das doenças nos animais selvagens é praticamente inexistente (Al Dahouk et al., 2005).

A presença ou a criação de novas interfaces entre os animais domésticos e animais selvagens é um dos fatores mais importantes para a transmissão de doenças (Bengis et al., 2002). A infecção por *Brucella* sp. é endêmica em várias espécies selvagens (Godfroid et al., 2005), sendo que todas as espécies de *Brucella* spp. podem infectar diferentes espécies selvagens (Godfroid et al., 2005).

Animais selvagens podem agir como hospedeiros temporários ou como hospedeiros reservatórios, sendo importante diferenciar entre uma infecção temporária contraída de animais domésticos de uma infecção sustentável em animais silvestres (Godfroid 2002). Um exemplo é a descrição de Olsen (2010), que apresenta as principais espécies silvestres hospedeiras de *Brucella abortus* e *Brucella suis* nos Estados Unidos. O consenso é o de prevenir a reintrodução da infecção nos rebanhos, particularmente em regiões consideradas oficialmente livres da brucelose (Godfroid et al., 2010).

As espécies do gênero *Brucella* sp. causam a diminuição da eficiência reprodutiva e aborto em espécies selvagens e domésticas. Clinicamente é caracterizada por um ou mais sinais como o aborto, retenção de placenta, orquite, epididimite e mais raramente artrite. Além da presença de microorganismos em descargas uterinas e no leite (OIE 2009). Em humanos a brucelose é conhecida como “febre ondulante”, “febre do Mediterrâneo” ou “febre de Malta” transmitido pelo contato direto ou indireto com animais infectados ou produtos derivados de animais (Corbel 2006).

Desde 2001 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) objetivando diminuir o impacto negativo destas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade na pecuária nacional (Brasil

2006). Apesar do estabelecimento de programas de erradicação da brucelose, essa enfermidade continua sendo um problema de saúde pública mundial com severas consequências econômicas para a pecuária (Sreevatsan et al., 2000). Tornando os produtos vulneráveis às barreiras sanitárias e comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (Brasil 2003).

Existem muitas razões pelas quais a brucelose permanece endêmica e tornando o diagnóstico difícil, isso inclui o contínuo aumento de animais e expansão dos rebanhos bovinos, sem a devida identificação e descarte de fêmeas positivas além da movimentação de animais sem controle sanitário (Robinson 2003). *Brucella* sp. possui também a habilidade de sobreviver, replicar e permanecer em macrófagos levando a infecções crônicas, que é uma das características da brucelose, em animais que são naturalmente hospedeiros e aos humanos (Roop et al., 2009).

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

A utilização de testes moleculares como a reação da cadeia em polimerase (PCR) constitui uma alternativa rápida no diagnóstico de *Brucella* sp. Sendo que o diagnóstico pode ser feito a partir de materiais biológicos variados como o sangue e o leite (Godfroid et al., 2010).

1.1 Etiologia

As bactérias representantes do gênero *Brucella* são Gram negativas, cocobacilos curtos (0,6 – 1,5 μm x 0,5 – 0,7 μm), aeróbicas, imóveis, não formadoras de esporos, intracelulares facultativas, microaerófilas, pleomórficas, caracterizadas pela infecção do sistema mononuclear fagocitário, acometendo humanos e várias outras espécies de mamíferos (Alton et al., 1988).

O gênero *Brucella* pertence a subdivisão alpha-2 das Proteobactérias, juntamente com *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* e *Rickettsia* (Yanagi and Yamasato, 1993). Fazendo parte do gênero *B. abortus* (bovinos,

bubalinos, cervídeos, canídeos e humanos), *B. suis* (suínos, humanos e bovinos), *B. melitensis* (caprinos, bovinos, ovinos, canídeos e humanos), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. ovis* (ovinos) e *B. canis* (canídeos e humanos), *B. ceti* (golfinhos e baleias), *B. pinnipedialis* (focas e leões-marinhos) (Cloeckert et al., 2001) e mais recentemente foram descritas *B. microti* (Scholz et al., 2008) e *B. inopinata* (Scholz et al., 2010).

As brucelas são divididas de acordo com a morfologia da colônia, em lisas (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*) e rugosas (*B. ovis* e *B. canis*), o fenótipo liso é devido à presença de lipopolissacarídeos compostos pelo lipídeo A e a cadeia de polissacarídeos O, enquanto o tipo rugoso não possui a cadeia O (Cardoso et al., 2006). A divisão em biotipos ocorre em *B. melitensis* com os biotipos 1, 2 e 3, *B. abortus* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 e a *B. suis* 1, 2, 3, 4 e 5. As brucelas do tipo rugosa não apresentam biotipos (Whatmore et al., 2009).

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

1.2 Epidemiologia

A brucelose é uma das zoonoses de maior importância mundial, particularmente nos países em desenvolvimento e em regiões particulares do Mediterrâneo, ocidente da Ásia e partes da África e da América Latina (Corbel 1997; Trujillo et al., 1994). Alguns países da região central e norte da Europa, Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia estão livres do agente (OIE 2009). É classificada como Grupo de Risco III pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OIE 2009).

No Brasil a brucelose bovina é endêmica, segundo estudos sorológicos realizados no ano de 1975, sendo encontrada em todas as regiões do país (Brasil 1977). A prevalência da brucelose no Brasil no período de 1989-1998 se manteve entre 4% e

5% (Poester et al., 2002). Inquéritos soroepidemiológicos no período de 2001 a 2004 demonstraram que a doença está disseminada em todo o país, existindo diferença de prevalência entre regiões e estados (Lage 2008; Paulin & Ferreira Neto 2002).

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

No estado do Mato Grosso do Sul a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3% semelhante à de 1975 no estado do Mato Grosso (Poester et al., 2002). Monteiro et al. (2006) executaram um estudo sorológico na região do planalto utilizando o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol em 2376 amostras de soro bovino, encontrando uma prevalência real individual estimada em 5,6% dos animais e a prevalência de rebanhos infectados de 37,3%, enquanto que Pellegrin et al. (2006) testaram na região do Pantanal 309 animais em 16 rebanhos utilizando as referidas técnicas, estimando a prevalência de 1,36% sendo que sete das propriedades tinham pelo menos um animal positivo.

Chate et al. (2009) buscando caracterizar a situação epidemiológica da brucelose bovina no estado do Mato Grosso do Sul amostraram 14.849 animais, totalizando 1.004 propriedades, o teste utilizado foi o do antígeno acidificado tamponado, encontrando uma prevalência de 12,6% no Pantanal e 4,5% na região do planalto.

Todas as brucelas podem infectar diversas espécies selvagens. Espécies clássicas de brucelas têm sido isoladas de uma grande variedade de espécies selvagens como bisões (*Bison bison*), javali (*Sus scrofa*), suínos ferais (*Sus scrofa*), raposa (*Vulpes vulpes*), lebres (*Lepus europaeus*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), renas (*Rangifer tarandus*), uapiti (*Cervus canadensis*) (Godfroid 2002). Apesar da maioria das espécies de *Brucella* ssp. possuírem um hospedeiro primário, a infecção pode alcançar outros hospedeiros alternativos (Tessaro 1986).

No Brasil Mayor et al. (2006) encontraram anticorpos anti-Brucela em catetos (*Tayassu tajacu*) na região amazônica (4/41 animais). Na região do pantanal do Mato Grosso do Sul Elisei et al. (2010) coletaram o sangue de 44 veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*), e para o diagnóstico de *Brucella* spp. aplicando a PCR, observando que 20,4% das amostras foram positivas. Mathias et al. (1999) não

encontraram nenhum veado-campeiro (n=17) com anticorpos anti-*Brucella* na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul.

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

No estado da Carolina do Sul nos Estados Unidos Corn et al. (2009) descreveram uma prevalência de 14% em suínos ferais (7/50) positivos no teste do AAT e na prova do rivanol. Na Europa lebres e javalis tem sido os principais reservatórios de *B. suis* biovar 2. Apesar de alguns países europeus possuírem o status de zona livre da brucelose, estes países possuem o reservatório de *Brucella* spp. nos animais selvagens, podendo ameaçar os programas de erradicação. Por isso os animais de vida livre devem ser cuidadosamente monitorados prevenindo a re-emergência da brucelose (Godfroid 2002).

1.3 Transmissão

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

A transmissão vertical para as crias pode ocorrer através da alimentação com leite infectado (Roop et al., 2003), também filhos de vacas brucélicas podem se infectar durante a gestação, com *Brucella* sp. persistindo em seus pulmões e linfonodos

regionais (OMS,1986). O pasto pode ser contaminado por fezes de bezerros que se alimentam com o leite infectado (Acha & Szyfres, 2001).

O controle e a erradicação da brucelose têm importantes implicações na saúde pública, já que a prevenção da brucelose humana depende predominantemente do controle da doença nos animais. A ocorrência da brucelose nos humanos é geralmente ocupacional ou devido ao contato ambiental com os animais infectados (Corbel 2006) ou a ingestão de alimentos de origem animal como o queijo e o leite não pasteurizado (Poester 2002). Em humanos a brucelose pode ser causada por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* biovars 1, 2, 3, 4 e 5 e raramente *B. canis* e brucelas de mamíferos marinhos (Godfroid 2002).

1.4 Patogenia

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

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

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

As cepas lisas de *Brucella* spp. geralmente invadem as células hospedeiras mais eficientemente que as cepas rugosas, sugerindo que a cadeia O de lipopolissacarídeos (LPSO) possui um papel importante na sua virulência (Ko & Splitter, 2003). A LPSO protege contra a morte bacteriana dentro do fagolisossomo e inibe a apoptose celular evitando a ativação da resposta imune (Porte et al., 2003; Jiménez de Bagüés et al., 2004; Pei et al., 2006), agindo como um imunomodulador da proteína apresentadora de antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) da classe II (Forestier et al., 2000).

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

Os locais com maior disponibilidade de eritritol são o útero grávidico, tecidos mamários, ósteoarticulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (Carter 1991). A *B. abortus* tem um forte tropismo pelo útero durante o último trimestre da gestação, devida a alta concentração de eritritol e hormônios estereoidais. Embora, a *Brucella abortus* S19 seja atenuada impossibilitando a sua multiplicação em presença de eritrito (Paulin 2003). O eritritol favorece a sobrevivência bacteriana, uma vez que possa ser metabolizado por *Brucella* sp. como uma fonte de carbono e energia (Samartino & Enright, 1996).

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

Touros infectados podem desenvolver sinais sistêmicos da infecção incluindo febre, anorexia e depressão, apesar da infecção ser frequentemente inaparente (Campero et al., 1990). A lesão mais significativa induzida por *B. abortus* em touros é a orquite

(Trichard et al., 1982). As reações inflamatórias são do tipo necrosante nas vesículas seminiais, testículos e epidídimos, podendo provocar sub-fertilidade, infertilidade ou esterilidade e consequente atrofia do órgão afetado (OMS, 1986).

No aparelho locomotor usualmente desenvolve uma sinovite fibrinosa à granulomatosa com a formação de projeções vilosas proliferativas e artrite com erosão articular que pode estar associada com uma bursite supurativa granulomatosa (Johnson et al., 1994).

A infecção da glândula mamária pode ocorrer pela transmigração de leucócitos infectados com *Brucella* sp. para os alvéolos mamários, fornecendo um local de replicação nos alvéolos e ductos, com subsequente migração bacteriana da glândula mamária para os linfáticos e destes para os linfonodos supramamários regionais (Adams 2002; Meador et al., 1989).

1.5 Interface da transmissão de *Brucella* sp. entre animais domésticos e silvestres

A brucelose, na qual possui uma distribuição mundial e afeta diversa espécie de mamíferos, incide tanto nos animais domésticos como nos silvestres. A transmissão tende a ocorrer em ambas às direções, apesar de que em certas regiões alguns hospedeiros têm sido identificados por exercer papel importante na transmissão do patógeno (Godfroid 2002).

A presença da brucelose nos animais domésticos sempre foi motivo de apreensão para as autoridades sanitárias e produtores de diversos países devido à ocorrência de abortos e prejuízos econômicos (Bienen & Tabor 2006). Além da possibilidade de rebanhos classificados como “livres da brucelose” serem contaminados por fontes silvestres. Alguns países já buscam estratégias para o monitoramento de *Brucella* sp. em animais silvestres, principalmente nas espécies de mamíferos que são possíveis reservatórios da brucelose para humanos e animais domésticos (Böhm et al. 2007).

Uma preocupação crescente para as espécies silvestres, principalmente as que estão em processo de extinção ou que vivem em ambientes fragmentados, é a de serem afetadas pela introdução de patógenos derivados de hospedeiros domésticos. Muitas das infecções são originalmente introduzidas na população de animais silvestres devido ao contato com animais domésticos infectados (Dobson & Meagher, 1996).

Sendo que a transmissão de doenças entre animais selvagens e domésticos pode ser de particular interesse em relação aos ungulados selvagens, pois frequentemente dividem o habitat com animais domésticos (Böhm et al. 2007).

A introdução de um indivíduo infectado não é um indicador suficiente da transmissão de *Brucella* sp. para outros animais. Uma combinação de fatores deve ser levada em consideração, incluindo a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro, dose infecciosa, contato com animais infectados, infectividade sazonal, manejo e fatores ambientais (Godfroid 2002).

Para ser obtida mais informações em relação a estes aspectos é necessário levantar informações da circulação de *Brucella* sp. em espécies domésticas e selvagens, em espécies onde este patógeno vem ocorrendo e em que fatores ele interfere nas espécies afetadas. Já que a transmissão de *Brucella* sp. entre os animais é dinâmica. E os parasitas podem aumentar a mortalidade dos hospedeiros ou diminuir a sua fecundidade (Scott & Smith 1994).

A montagem de um modelo de atuação de *Brucella* sp. no ambiente é um fator importante, com a união de dados coletados durante o tempo, levantando parâmetros importantes para ser utilizado nas políticas de controle da brucelose e o entendimento da interface da transmissão de *Brucella* sp., podendo até mesmo servir de referência para planos futuros de controle da brucelose no país.

1.6 Diagnóstico

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

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

1.6.1 Diagnóstico Direto

Os métodos de diagnóstico direto incluem o isolamento e identificação do agente, a imunohistoquímica e a detecção dos ácidos nucleicos (Lage et al., 2006). Os métodos diretos são usados após a manifestação dos sintomas clínicos, quando a bactéria já esta disseminada no rebanho. Portanto, não são recomendadas para individualizar as fontes de infecção, mas para confirmar focos da doença e caracterizar o agente circulante (Bathke1998).

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

O “padrão ouro” para o diagnóstico da brucelose é o isolamento e identificação de *Brucella* spp., pois esta técnica fornece o diagnóstico definitivo da doença, porém devido ao caráter zoonótico, o isolamento e identificação do agente é laborioso, possui perigo biológico devido ao manuseio de bactérias vivas, além da demora no processo de isolamento e o resultado que nem sempre é definitivo (Bricker 2002; Yu & Nielsen 2010). A vantagem desta técnica é a especificidade (Ocampo-Sosa et al., 2005). A identificação das espécies do gênero *Brucella* podem ser feitas através da análise das características fenotípicas, provas bioquímicas que identificam diferenças metabólicas entre as espécies e biótipos (Alton et al., 1975; Cloeckert et al., 2004).

Devido aos problemas inerentes ao isolamento e identificação de *Brucella* spp., a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) fornece um caminho adicional de detecção e identificação de *Brucella* spp. (OIE 2009). A PCR possui alta sensibilidade, é muito específica e facilmente adaptável a alta demanda além do processo ser rápido e simples. Além de permitir trabalhar com a bactéria morta (Bricker & Halling 1994).

Baily et al (1992) realizaram a PCR baseada no gene *BCSP31* utilizando um único par de *primers* oligonucleotídeos denominados B4 e B5 amplificando um segmento de 233 pb de um gene que codifica uma proteína de 31 kDa. Descrevendo assim um teste robusto, sensível e específico para *B. abortus* e *B. melitensis*. Da Costa

et al (1996) pesquisaram 98 bactérias que não pertenciam ao gênero *Brucella* e encontraram uma cepa que amplificou pertencente ao *Ochrobactrum*. Em 1995 Romero et al. desenvolveram um teste com primers que amplificavam um produto de 905 bp derivado da sequência 16S rRNA de *B. abortus*. Utilizaram amostras clínicas e observaram que somente o biótipo D de *Ochrobactrum anthropi* produziu um produto de 905 bp.

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

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

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

Em muitos casos a determinação do gênero é suficiente, porém há casos em que é necessário conhecer o biovar envolvido para tomar ações devidas. Várias técnicas de PCR foram descritas para a diferenciação do gênero *Brucella* em espécies e biótipos.

Bricker & Halling (1994) descreveram a AMOS PCR que representa as iniciais das espécies que a PCR é capaz de detectar (*B. abortus* biovars 1, 2 e 4; *B. melitensis* 1, 2 e 3; *B. ovis* e *B. suis* biovar 1). A AMOS explora o polimorfismo decorrente da localização espécie-específica do elemento IS711 no cromossomo de *Brucella* spp., através da utilização de cinco *primers*. A identidade é determinada pelo tamanho dos

produtos amplificados a partir de quatro *primers* espécie-específicos pela distancias do elemento IS711 que é amplificado pelo *primer* restante.

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

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

Mayer-Scholl (2010) descreveu uma técnica de PCR *multiplex* para a diferenciação de todas as nove espécies de *Brucella* spp. reconhecidas, incluindo as espécies *B. microti*, *B. inopinata*, *B. ceti* e *B. pennipedialis*.

As principais desvantagens devido à utilização da PCR como ferramenta de diagnóstico é a contaminação do material de laboratório, presença de fatores inibidores de enzimas e ácido nucleico e o alto custo dos equipamentos e reagentes (Paulin & Ferreira 2003).

1.6.2 Diagnóstico Indireto

A sorologia é amplamente utilizada para o diagnóstico da brucelose, sendo usada como ferramenta estratégica para proceder ao monitoramento e vigilância de áreas ou regiões, além de vigiar zonas onde a doença já foi identificada (Alton et al., 1988).

Godfroid (2002) descreve que animais soropositivos não significam necessariamente que tenham uma infecção atual ou ativa no momento da amostragem.

Pois o teste sorológico permite apenas um diagnóstico presuntivo (Mackintosh et al., 2002). Quase todas as espécies vulneráveis a infecção por *Brucella* spp. podem perder a titulação de anticorpos, podendo constituir uma maior prevalência de brucelose do que a indicado pela pesquisa dos anticorpos.

Os anticorpos responsáveis por *B. abortus* em bovinos consistem de uma resposta inicial da IgM que é dependente da via de exposição, dose da bactéria e do estado sanitário do animal, seguida de uma produção quase que imediata de anticorpos IgG1 e depois a produção de pequenas quantidades das IgG2 e IgA (Nielsen et al., 1984). Os principais testes sorológicos detectam *Brucella* spp. de fenótipo liso, portanto não detecta a *B. ovis* e *B. canis*, sendo necessário antígeno específico de *Brucella* spp. do fenótipo rugoso (Gosfroid 2002; OIE 2000).

Bactérias do gênero *Brucella* demonstram uma relação genética próxima de alguns patógenos de plantas, e simbioses do gênero *Agrobacterium* e *Rhizobium* e bem como, patógenos de animais e bactérias oportunistas ou do solo como o *Ochrobactrum* (OIE, 2009). Portanto reações cruzadas podem ocorrer, e são principalmente derivadas dos anticorpos IgM (Corbel, 1985). Os testes que detectam principalmente IgG1 são os mais úteis, porque os anticorpos IgG2 e IgA estão presentes em pequenas quantidades e as IgM não são desejáveis pois levam aos resultados falsos positivos (Nielsen et al., 1984).

Vários testes sorológicos estão disponíveis e os principais testes utilizados são os recomendados pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE). O Brasil possui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal que emprega o teste do AAT como teste de triagem e os animais que reagem a este teste são submetidos ao teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol (Brasil, 2006).

O AAT é um teste qualitativo rápido, prático, custo reduzido e de boa sensibilidade, possui um pH de $3,65 \pm 0,05$ que previne a aglutinação pela IgM e estimula a aglutinação pela IgG1 reduzindo reações não específicas (Allan et al., 1976; Paulin & Ferreira Neto, 2003). Entretanto reações falsas negativas podem ocorrer, principalmente devido ao fenômeno de prozona (OIE 2000). Anticorpos resultantes da vacinação com a B19 e alguns anticorpos cruzados são detectados por este teste, sendo necessário usar outros testes para confirmar o animal reator como infectado (Brasil, 2004; OIE 2000).

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

O teste de soroaglutinação em tubos (SAT) é utilizado juntamente com o 2-ME para a confirmação de resultados positivos e permite diferenciar a infecção recente da crônica. A incubação é feita por 48 horas e o resultado é baseado no grau de aglutinação do antígeno e na firmeza dos grumos, após agitação suave do tubo (Brasil 2006).

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

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

Muitos dos testes sorológicos não foram validados em animais selvagens, contudo várias investigações sorológicas têm sido feitas em animais selvagens de vida livre e em zoológicos, objetivando-se acessar a presença ou a disseminação de *Brucella*

spp. em diferentes espécies selvagens e classificar as espécies ou indivíduos como expostos ou não expostos (Godfroid 2002). Testes sorológicos utilizados para a detecção de anticorpos de *Brucella abortus* em bovinos tem sido usados para o diagnóstico de diferentes espécies de ungulados como o Caribu (*Rangifer tarandus caribou*), veado-vermelho (*Cervus elapus*) e gamo (*Dama dama*) (Godfroid 2002) ou em inquéritos epidemiológicos (Aguirre et al., 1995; Gomo et al., 2011; Muma et al., 2011). Muitos dos testes sorológicos não foram validados em animais selvagens

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. **Organización Panamericana de La Salud**. 3. Ed. Washington, p. 28-55, 2001.
- ADAMS, L. G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 553-61, Dec 2002. ISSN 0378-1135. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414171> >.
- AGUIRRE A. A.; HANSEN, D. E.; STARKEY, E. E.; MCLEAN, R. J. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the united States. **Prev Vet Med**, v.21, p. 313-322, 1995.
- ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P.; MACNAUGHT, D.J. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **J. Hyg. Camb**, v.76, p. 287-298, 1976.
- ALTON, G. G.; JONES, L.M.; PIETZ, D. E. Laboratory techniques in brucellosis. **World Health Organization**. 2° ed. Geneva, p. 175, 1975.
- ANDERSON, T. D.; CHEVILLE, N. F. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. **Am J Pathol**, v. 124, n. 2, p. 226-37, Aug 1986. ISSN 0002-9440. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3090887> >.

BADDOUR, M. M.; ALKHALIFA, D. H. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. **Can J Microbiol**, v. 54, n. 5, p. 352-7, May 2008. ISSN 0008-4166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18449219> >.

BAILY, G. G. et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 4, p. 271-5, Aug 1992. ISSN 0022-5304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1495123> >.

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

BEJA-PEREIRA, A. et al. DNA genotyping suggests that recent brucellosis outbreaks in the Greater Yellowstone Area originated from elk. **J Wildl Dis**, v. 45, n. 4, p. 1174-7, Oct 2009. ISSN 1943-3700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901392> >.

BIENEN, L.; TABOR, G. Applying an ecosystem approach to brucellosis control: can an old conflict between wildlife and agriculture be successfully managed?. **From Ecol Environ**, v.4, n.6, p. 319-327, 2006.

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

BÖHM, M. et al. Wild deer as a source of infection for livestock and humans in the UK. **The Vet J**, n. 174, p. 260-276, 2007.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**. Brasília, 2006. Disponível em: <

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf >

BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. 9p. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Defesa Animal. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm> >.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 435-46, Dec 2002. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414163> >.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 11, p. 2660-6, Nov 1994. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7852552> >.

CAMPERO, C. M. et al. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 24, n. 3, p. 235-46, Mar 1990. ISSN 0165-2427. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2111057> >.

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

CHATE, S. C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arq Bras Med Vet Zootec**, n.61, p. 46-55, 2009.

CLOECKAERT, A. et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. **Vaccine**, v. 22, n. 21-22, p. 2827-35, Jul 2004. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246618> >.

_____. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. **Microbes Infect**, v. 3, n. 9, p. 729-38, Jul 2001. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489421> >.

COMERCI, D. J. et al. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. **Cell Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 159-68, Mar 2001. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11260139> >.

CORBEL, M. J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reaction. **Vet Bull**, v.55, p. 927-942, 1985.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 2, p. 213-21, 1997 Apr-Jun 1997. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9204307> >.

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

CORN, J. L. et al. Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production. **J Wildl Dis**, v. 45, n. 3, p. 713-21, Jul 2009. ISSN 0090-3558. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617481> >.

CRAWFORD, R. P.; ADAMS, L. G.; RICHARDSON, B. E. Effect of dose of *Brucella abortus* strain 19 in yearling heifers on the relative risk of developing brucellosis from challenge exposure with strain 2308. **Am J Vet Res**, v. 51, n. 11, p. 1837-40, Nov 1990. ISSN 0002-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122782> >.

DA COSTA, M. et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **J Appl Bacteriol**, v. 81, n. 3, p. 267-75, Sep 1996. ISSN 0021-8847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810054> >.

DOBSON, A.; MEAGHER, M. The population dynamics of brucellosis in the Yellowstone National Park. **Ecology**, n.77, p. 1026-1036, 1996.

ENRIGHT, F. M. et al. Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 26, n. 2, p. 171-82, Oct 1990. ISSN 0165-2427. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124401> >.

FORESTIER, C. et al. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. **J Immunol**, v. 165, n. 9, p.

5202-10, Nov 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046053> >.

GALL, D.; NIELSEN, K. Comparison of some methods for determining cutoff values for serological assays: a retrospective study using the fluorescence polarization assay. **J Immunoassay Immunochem**, v. 22, n. 2, p. 85-98, 2001. ISSN 1532-1819. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486814> >.

GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. **Rev Sci Tech**, v. 21, n. 2, p. 277-86, Aug 2002. ISSN 0253-1933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11974615> >.

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Croat Med J**, v. 51, n. 4, p. 296-305, Aug 2010. ISSN 1332-8166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718082> >.

GOMO, C. et al. Survey of brucellosis at the wildlife-livestock interface on the Zimbabwean side of the Great Limpopo Transfrontier Conservation Area. **Trop Anim Health Prod**, Jun 2011. ISSN 1573-7438. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21643664> >.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 281-97, Dec 2002. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414149> >.

JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M. P. et al. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2429-33, Apr 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039375> >.

JOHNSON, B. et al. Experimental *Brucella abortus* strain 19 arthritis in young cattle. **J Vet Diagn Invest**, v. 6, n. 1, p. 56-61, Jan 1994. ISSN 1040-6387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8011783> >.

KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 65-78, Jan 2003. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525425> >.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, S. M.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose Bovina: Uma atualização. **Rer Bras Reprod Anim**, v.32, n.3, p. 202-212 jul./set, Belo Horizonte, 2008.

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

LUCERO, N. E. et al. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiol Infect**, v. 136, n. 4, p. 496-503, Apr 2008. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559694> >.

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

MATHIAS, L. A.; GIRIO, R. J.; DUARTE, J. M. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. **J Wildl Dis**, v. 35, n. 1, p. 112-4, Jan 1999. ISSN 0090-3558. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073359> >.

MAYER-SCHOLL, A. et al. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. **J Microbiol Methods**, v. 80, n. 1, p. 112-4, Jan 2010. ISSN 1872-8359. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19887090> >.

MAYOR, P. et al. A health evaluation in a colony of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the Eastern Amazon. **Res Vet Sci**, v. 81, n. 2, p. 246-53, Oct 2006. ISSN 0034-5288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487552> >.

MEADOR, V. P.; DEYOE, B. L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. **Vet Pathol**, v. 26, n. 6, p. 513-5, Nov 1989. ISSN 0300-9858. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2513676> >.

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

MUMA, J. B. et al. *Brucella* seroprevalence of the Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) and Black lechwe (*Kobus leche smithemani*): exposure associated to contact with cattle. **Prev Vet Med**, v. 100, n. 3-4, p. 256-60, Jul 2011. ISSN 1873-1716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536335> >.

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

NIELSEN, K. et al. Field trial of the brucellosis fluorescence polarization assay. **J Immunoassay Immunochem**, v. 23, n. 3, p. 307-16, 2002. ISSN 1532-1819. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12227417> >.

OCAMPO-SOSA, A. A.; AGÜERO-BALBÍN, J.; GARCÍA-LOBO, J. M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. **Vet Microbiol**, v. 110, n. 1-2, p. 41-51, Sep 2005. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16029934> >.

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

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

OLSEN, S. C. Brucellosis in the United States: Role and significance of wildlife reservoirs. **Vaccine**, 28S, F73-F76, 2010.

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

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J. S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arq Inst Biol**, v.69 p. 105-112, 2002.

PEI, J.; FICHT, T. A. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 440-50, Jan 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688125> >.

PEI, J. et al. *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. **Infect Immun**,

v. 74, n. 5, p. 2667-75, May 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622203> >.

PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. M. H.; SERENO, J. R. B.; LAGE, A. P.; LEITE, P. C.; LEITE, R. C.; RAVAGLIA, E. Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares. **Comunicado técnico**. n.58, Corumbá, 1-4, 2006. Disponível em: < <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT58.pdf> >

PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. **Microbes Infect**, v. 2, n. 7, p. 829-35, Jun 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10955964> >.

PIZARRO-CERDÁ, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. **Infect Immun**, v. 66, n. 12, p. 5711-24, Dec 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826346> >.

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

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Vet Microb**, n.90, p. 55-62, 2002.

PORTE, F. et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1481-90, Mar 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595466> >.

ROOP, R. M. et al. *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 57-76, 2003. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730323> >.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 55-63, Jan 1996. ISSN 0147-9571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654046> >.

SANTOS, R. L. et al. Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast. **Theriogenology**, v. 46, n. 6, p. 1077-83, Oct 1996. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727971> >.

SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, n. Pt 2, p. 375-82, Feb 2008. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218934> >.

SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n. Pt 4, p. 801-8, Apr 2010. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661515> >.

SCOTT, M. E.; SMITH, G. **Parasitic and infectious diseases: epidemiology and ecology**, Academic Press, San Diego, California, 398pp, 1994.

SIEIRA, R. et al. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. **J Bacteriol**, v. 182, n. 17, p. 4849-55, Sep 2000. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940027> >.

TESSARO, S. V. The existing and potential importance of brucellosis and tuberculosis in canadian wildlife: a review. **Can Vet J**, v. 27, n. 3, p. 119-24, Mar 1986. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17422637> >.

TRICHARD, C. J. et al. Unilateral orchitis in a bull caused by *Brucella abortus* biotype1. **J S Afr Vet Assoc**, v. 53, n. 1, p. 60-2, Mar 1982. ISSN 1019-9128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7097709> >.

T RUIJILLO, I. Z.; ZAVALA, A. N.; CACERES, J. G.; MIRANDA, C. Q. Brucellosis infection. **Infec Dis Clin of Nor Ame**, v.8, p. 225-241, 1994.

VEMULAPALLI, R. et al. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 6, n. 5, p. 760-4, Sep 1999. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473532> >.

VIZCAÍNO, N. et al. DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic

island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide . **Microbes Infect**, v. 6, n. 9, p. 821-34, Jul 2004. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374004> >.

YU, W. L.; NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. **Croat Med J**, v. 51, n. 4, p. 306-13, Aug 2010. ISSN 1332-8166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718083> >.

WATARAI, M., MAKINO, S., MICHIKAWA, M., YANAGISAWA, K., MURAKAMI, S., SHIRAHATA, T. Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. **Infec and Imm**, v.70, p. 4818–4825, 2002.

WHATMORE, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. **Infect Genet Evol**, v.9, n.6, p. 1168–1184, 2009.

eVIDENCIA ePIDEMIOLOGICA de *BRUCELLA SP* em BOVINOS E VEADOS-CAMPEIROS (*OZOTOCEROS BEZOARTICUS*) EM SIMPATRIA NO PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL

NP Zimmermann ^{1/*}, IAHF Schabib Perez¹, AO Pellegrin ²

¹ Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil ² Embrapa Pantanal, Corumbá, MS

A brucelose é uma zoonose de grande importância mundial, pois além de afetar a saúde dos humanos, o aborto provocado pela infecção causa sérios prejuízos econômicos aos animais de produção, e representa um risco à biodiversidade em se tratando de mamíferos silvestres. Os testes sorológicos são utilizados na rotina para a identificação de animais expostos ao agente infeccioso. Adicionalmente, o diagnóstico molecular é uma ferramenta empregada na detecção e estudos epidemiológicos da brucelose. O objetivo deste trabalho foi investigar e comparar a ocorrência de *Brucella* sp. em veados-campeiros e bovinos em simpatria na sub-região Pantaneira da Nhecolândia, município de Corumbá/MS. O sangue total com e sem anticoagulante foi coletado de 59 veados-campeiros e 132 bovinos. A PCR foi realizada utilizando-se iniciadores gênero-específicos direcionados ao gene BCSP31 de *Brucella* sp. Os soros positivos ao teste do AAT foram confirmados pelo teste do 2-ME. Dentre os cervídeos, três animais foram positivos para na PCR e dois no 2-ME. Nos bovinos, 20 indivíduos foram positivos na PCR e 25 no 2-ME. Os resultados do presente trabalho sugerem que a *Brucella* spp. circula no ambiente do Pantanal Sul-Mato-Grossense entre os veados-campeiros e bovinos em simpatria.

Palavras-chave: brucelose – cervídeos – bovinos – Pantanal - PCR - sorologia.

Brucellosis is a zoonotic disease of global importance, as besides affect the health of humans, abortion caused by the infection causes serious economic losses to livestock, and represents a risk to biodiversity when it comes to wild mammals. Serological tests are routinely used for identification of animals exposed to the infectious agent. Additionally, the molecular diagnosis is a tool employed in the detection of brucellosis and epidemiological studies. The aim of this study was to investigate and compare the occurrence of *Brucella* ssp. in pampas deer and cattle in sympatry in the subregion Pantaneira of Nhecolândia, Municipality of Corumbá / MS. The whole blood with and

without anticoagulant was collected from 59 pampas deer and 132 cattle. PCR was performed using primers directed to the genus-specific gene BCSP31 from *Brucella* sp. Serum samples positive by AAT test were confirmed by 2-ME test. Among the deer, three animals were positive in PCR and two in the 2-ME test. In cattle, 20 individuals were positive by PCR and 25 in 2-ME test. The results of this study suggest that the *Brucella* spp. circulates in the environment of the Pantanal of Mato Grosso do Sul state between pampas deer and cattle in sympathy.

Keywords: Brucellosis - deer - cattle - Pantanal - PCR – serology

A brucelose é uma zoonose de grande importância mundial, e está relacionada à infecção nos animais de produção e na contaminação de alimentos de origem animal (Schmoock et al. 2011). É a causa de aborto em fêmeas infectadas, causando prejuízos econômicos e a biodiversidade quando presente nos animais de produção e nos animais silvestres respectivamente. As bactérias do gênero *Brucella* são Gram negativas intracelulares facultativas, caracterizada pela infecção do sistema mononuclear fagocitário (Alton et al. 1988) e por essa razão possuem mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro Ficht (2003).

A brucelose é endêmica no Brasil (Paulin & Ferreira Neto 2003), tendo sido registrada na região do Pantanal em bovinos, porcos monteiro (*Sus scrofa*) e cervídeos (Pellegrin et al., 2006; Paes et al., 2008; Chate et al., 2009; Elisei et al. 2010). Uma característica da criação extensiva de bovinos na região do Pantanal decorre do fato de que estes animais compartilham ambientes com ungulados de vida livre como veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*), pecarídeos e porcos ferais, os quais amparam numerosa quantidade de indivíduos (Santos 2002; Desbiez 2009).

O veado-campeiro possuía uma ampla distribuição na América do Sul entre as latitudes 5° e 40° S (Jackson 1987). Entretanto, essa ampla distribuição tem sido

drasticamente reduzida por perda de hábitat, caça e competição com herbívoros domésticos (Merino et al., 1997). No Pantanal, a população foi estimada em torno de 60.000 indivíduos (Mourão et al. 2000). Porém, práticas como o desmatamento das áreas das cordilheiras (Junk & Silva 1999) e queimadas sistemáticas do caronal para a implantação e melhoria das pastagens (Cardoso et al. 2000 a,b; Cardoso et al. 2003) tem despertado preocupação quanto a sustentabilidade dos sistemas produtivos do Pantanal.

É reportado que a introdução de bovinos em áreas com abundância de animais selvagens, pode interferir na dinâmica dos ciclos de transmissão dos agentes infecciosos resultando em surgimento de doenças (Bengis et al. 2002; Muma et al. 2007). Após um período, fica difícil de identificar onde ocorre a fonte de infecção, se nos animais domésticos ou silvestres (Aguirre et al. 1995).

Aguirre et al. (1995) descreveram a infecção por *Brucella* sp, em veado-mula (*Odocoileus hemionus*) e veado-vermelho (*Cervus elaphus*), evidenciando que esses haviam sido expostos através do contato com bovinos. A transmissão de *Brucella* sp. tende a ocorrer em ambas às direções, da fauna para os animais de produção ou vice-versa. Entretanto, em certas regiões alguns hospedeiros têm sido identificados por exercer papel importante como fonte de infecção do patógeno (Godfroid 2002). Alguns países já buscam estratégias para o monitoramento de *Brucella* sp. em mamíferos silvestres e domésticos simpátricos, principalmente nas espécies de que são possíveis reservatórios para humanos e animais domésticos (Böhm et al. 2007) .

O diagnóstico “padrão ouro” da Brucelose é o isolamento e caracterização bioquímica dos isolados obtidos, sendo esta técnica considerada de alta especificidade, porém sua utilização fica restrita a poucos laboratórios (Alton et al. 1988). Os testes sorológicos são rotineiramente utilizados em inquéritos epidemiológicos por demonstrar

o percentual de animais expostos ao agente infeccioso, apesar da possibilidade de ocorrência de resultados cruzados, e da baixa sensibilidade no estágio inicial da infecção (Al Dahouk et al. 2003; Schmoock 2011).

O diagnóstico molecular é uma ferramenta que vem somar para a pesquisa epidemiológica da brucelose. Beja-Pereira et al. (2009) demonstraram através da genotipagem de isolados que o surto de brucelose em bovinos, na área do parque Yellowstone nos Estados Unidos, provem do veado-vermelho (*Cervus elaphus*), devido a semelhança entre os isolados dos bovinos e veados-vermelhos

O objetivo deste trabalho foi o de identificar a exposição e comparar a ocorrência de *Brucella* spp. em veados-campeiros e bovinos em simpatria, localizados em uma região do Pantanal da Nhecolândia, utilizando como ferramentas de diagnóstico a PCR e a sorologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo e animais - Os animais que participaram deste estudo estavam localizados na sub-região Pantaneira da Nhecolândia, município de Corumbá-MS, em propriedades rurais de pecuária extensiva totalizando uma área de aproximadamente 20.000 ha de extensão. Foram coletadas amostras de sangue de 59 veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) e 132 bovinos através da coleta de sangue venoso e empregado coletores do tipo vacutainer com agulhas 25 x 8. Foram utilizados tubos com e sem EDTA sódico para a obtenção de sangue total e soro respectivamente. O material foi mantido refrigerado até ser aliquotado e armazenado em freezer -20 °C.

Captura dos veados-campeiros - Para a captura dos veados-campeiros foi utilizado uma pistola de propulsão pneumática (Modelo 35, Distinject[®], Basel, Suíça) com dardos tranquilizantes contendo a preparação anestésica. Para animais com uma média de 30 kg foi utilizado a Tiletamina-Zolazepam (Zoletil[®] 50), Cloridrato de xilazina (Rompun[®]) e sulfato de atropina (Atropina 1% Fagra[®]) nas doses correspondentes de 2,5 mg/kg, 1 mg/kg e 0,05 mg/kg. Após o término dos procedimentos no animal, foi utilizado o reversor do cloridrato de xilazina com a aplicação de ioimbina. Objetivando monitorar os parâmetros fisiológicos decorrentes da anestesia, durante o período anestésico todos os animais tiveram a temperatura corporal, frequência cardíaca, respiratória e reflexos monitorados a cada 15 minutos. Todos os animais foram identificados com coleiras numeradas.

Aprovação do projeto - Este projeto teve aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que permitiu a anestesia e coleta de material biológico desta espécie selvagem sob o N^o de autorização: 20029-1 / código de autenticação: 69745473.

Diagnóstico sorológico - Os animais sororeagentes ao teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) foram submetidos ao teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) e o teste de soroaglutinação lenta em tubos, descrito em Brasil (2006). O AAT foi feito utilizando 30 µl de soro por área da placa e homogeneizado com 30 µl de antígeno. Foram considerados positivos os animais que apresentaram a formação de grumos anterior a 4 minutos. A interpretação do 2-ME e do teste de soroaglutinação lenta em tubos foi realizado de acordo com o grau de aglutinação, sendo classificado como completo, incompleto ou negativo. Nestes testes são realizadas diluições seriadas, no

soro a ser testado, de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200, sendo que a reação positiva no teste do 2-ME, a partir de 1:25, deve ser considerada como indicativo de infecção (Quadro 1 e 2). Um animal foi considerado positivo no teste sorológico quando o mesmo é positivo no AAT e na prova confirmatória do 2-ME. O 2-ME e o teste de soroaglutinação lenta em tubos foram realizados no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais e Análise de Alimentos (LADDAN) da Agencia Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO).

Diagnóstico molecular - A extração de DNA do sangue dos animais foi realizado de acordo com Araújo et al. (2009) no Laboratório de Engenharia Genética da Embrapa Gado de Corte, obtendo a concentração final de 100 ng/μl, após quantificação em espectrofotômetro (Nano Drop[®] ND-1000). Para a amplificação do DNA foi utilizado o par de *primers* gênero-específico descrito por Bailly et al. (1992) B4/B5: B4 (5'-TCGGTTGCCAATATCAA-3') e B5 (5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3') que amplificam fragmentos de 233pb referente ao gene BCSP31 que codifica uma proteína imunogênica de 31 KDa. Para o controle positivo foi utilizado DNA de *Brucella abortus* 2308 e *B. abortus* RB51. Para a PCR utilizando os *primers* B4/B5 foi utilizado o protocolo de Miyashiro et al. (2007) modificado, com um volume total de 20 μl contendo: 2 μl de tampão PCR 10x (1x); 0,8 μl de MgCl₂ (3 mM); 0,6 μl de dNTP (200 μM); 1 μl de cada *primer* (1 μM); 0,3 μl de *Taq*DNA-polimerase (2,5 UI); 1 μl do DNA a ser testado (100ng/μl) e H₂O (*Mili-Q*[®]) em quantidade suficiente para completar o volume total da reação. A reação de amplificação foi feita no aparelho termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler Gradient[®]), onde a desnaturação inicial foi a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C/60 segundos, anelamento a 55°C/60 segundos e extensão a 72°C/45 segundos e uma extensão final a 72°C/10

minutos, para a adenilação da sequência formada (Miyashiro et al. 2007). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese de 80 V por 1 hora em gel de agarose na concentração de 1,0 %. O gel foi corado com SYBR GOLD (Invitrogen®) e visualizado pelo aparelho transiluminador (Lpix HE, Loccus Biotecnologia) sob a luz ultravioleta, sendo posteriormente fotodocumentado.

Análise estatística - Com base no programa nacional de erradicação da brucelose e tuberculose (PNCEBT), foram considerados positivos os animais que apresentaram reação positiva para o 2-ME ou com diagnóstico positivo pela PCR B4/B5 tanto para os bovinos quanto para cervídeos. Para testar a discordância dos testes diagnósticos em cada grupo foi calculado o teste de McNemar ($p < 0,01$). Para a execução da estatística foi utilizado o programa BioEstat®.

RESULTADOS

Foi detectada a presença de veados-campeiros sororeagentes para *Brucella* spp., com 10,17% de cervídeos com reação de soroaglutinação positiva para o teste sorológico de triagem AAT (6/59), em dois destes animais (3,4%) foi confirmado o diagnóstico pelo teste do 2-ME (2/59). A PCR detectou a presença do DNA de *Brucella* spp. no sangue de três cervídeos (3/59), sendo que, apenas um cervídeo foi soropositivo no 2-ME e na PCR.

Dos 132 bovinos coletados, 36 animais apresentaram reação de soroaglutinação no teste do AAT (36/132), destes, 25 animais (18,93%) foram soropositivos para o teste do 2-ME. Pela PCR foi possível detectar o DNA de *Brucella* spp. no sangue de 20 bovinos (15,15%), sendo que destes, 11 encontravam-se soropositivos no 2-ME. E nove bovinos foram soronegativos com positividade na PCR. Os produtos amplificados pela

PCR utilizando o *primer* B4/B5 apresentaram um produto de aproximadamente 233 pb (figura 1).

A estatística utilizando o teste de McNemar, para comparação dos testes diagnósticos sorológico e molecular, não foi significativa para os grupos dos veados-campeiros e bovinos, demonstrando que não há discordância significativa na proporção dos resultados utilizando os testes 2-ME e a PCR B4/B5 ($\alpha = 0,01$) (tabela I e II).

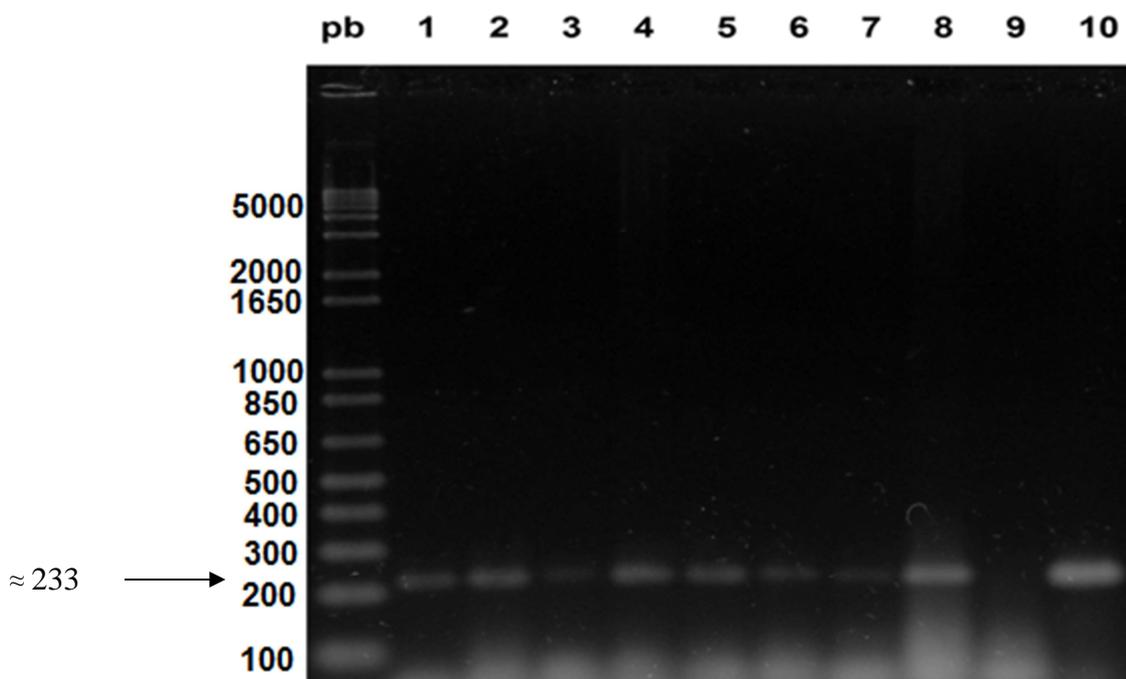


FIGURA 1: Fotodocumentação de gel de agarose a 1% corado com SYBR GOLD (Invitrogen®) sob transiluminação UV; o par de *primer* B4/B5, que gerou produtos amplificados com ≈ 233 pb, indicando o DNA de *Brucella spp.* no sangue de *Ozotoceros bezoarticus* (8); e no sangue de bovinos (1-7). pb: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); 1 a 7: amostras de bovino; 8: amostra de veado-campeiro; 9: controle negativo bovino; 10: controle positivo de *B. abortus* 2308.

Tabela I - Resultados comparativos dos testes 2-ME e PCR na detecção de *Brucella* ssp. em veados-campeiros de uma região da Nhecolândia, Pantanal de Mato Grosso do Sul

		2-Mercaptoetanol		
		Positivos	Negativos	Total
PCR	Positivos	1	2	3
	Negativos	1	55	56
Total		2	57	59

Teste de McNemar - método exato $p = 1.00$

Tabela II - Resultados comparativos dos testes 2-ME e PCR na detecção de *Brucella* ssp. em bovinos de uma região da Nhecolândia, Pantanal de Mato Grosso do Sul

		2-Mercaptoetanol		
		Positivos	Negativos	Total
PCR	Positivos	11	9	20
	Negativos	14	98	112
Total		25	107	132

Teste do $X^2 = 0,695$
 $p > 0,01$

DISCUSSÃO

Em ambos cervídeos e bovinos estudados pode-se constatar a exposição de indivíduos frente a *Brucella* ssp. devido a presença de anticorpos, evidenciado pelos testes sorológicos AAT e 2-ME. A soroprevalência de 3,4% (2/59) dos veados-campeiros deste trabalho difere do resultado de Mathias et al. (1999) que pesquisaram a presença de anticorpos anti-*Brucella* em veados-campeiros (n=17) no Pantanal do Mato Grosso do Sul utilizando o teste de aglutinação em placas, AAT e o teste de fixação de complemento, não detectando animais sororeagentes.

Se considerarmos como positivos os resultados obtidos no teste do AAT nos veados-campeiros, a prevalência encontrada para a brucelose em cervídeos foi de 10,17%, dado equivalente ao último levantamento epidemiológico realizado em bovinos de corte no Pantanal, onde 12,6% dos animais testados foram positivos para a brucelose

pelo AAT (Chate et al., 2009). Porém os bovinos pesquisados na mesma área dos cervídeos diferiram quanto a soropositividade pelo teste do AAT para *Brucella* spp., sendo de 27,27% (36/132). Já a soroprevalência, considerando o 2-ME para os bovinos, de 18,93%, foi muito superior a encontrada por Pellegrin et al. (2006) de 1,36% que utilizaram o AAT e o teste confirmatório do 2-ME .

Alguns fatores contribuem para maior soropositividade nos bovinos, como o nível de cobertura vacinal, ocorrência de aborto, demora da eliminação de bovinos infectados, existência de áreas alagadiças na propriedade, maior densidade de animais e manejo reprodutivo das propriedades, já que uma das propriedades apresentou uma maior quantidade de animais positivos (Crawford et al., 1990; Paulin e Ferreira Neto, 2003; Pellegrin et al., 2006).

Estudos em infecções experimentais e naturais indicam que quase todas as espécies animais susceptíveis a infecção por *Brucella* spp. podem perder os títulos de anticorpos com o decorrer do tempo e a presença de infecções latentes, sem a conversão sorológica, complica ainda mais o problema (Godfroid 2002) com o aparecimento de resultados falso-negativos e camuflando a prevalência da brucelose. Embora, deve-se evidenciar que os testes diagnósticos utilizados são desenvolvidos e validados para os bovinos, podendo não apresentar as mesmas propriedades diagnósticas para os animais selvagens (Davis et al. 1990). Com isso, a utilização da PCR é vantajosa, pois irá detectar a presença de *Brucella* spp. independente da espécie animal utilizada.

Foram detectados três veados-campeiros positivos na PCR B4/B5 (3/59) sendo que um animal foi positivo para ambos os testes sorológicos e a PCR. Apesar da maior quantidade de cervídeos positivos na PCR B4/B5 do que no teste do 2-ME, não houve diferença na proporção entre os resultados dos testes sorológicos e molecular no grupo

dos cervídeos, não havendo, portanto, diferença significativa entre os resultados dos testes realizados. Elisei et al. (2010), utilizando o *primer* para o gene *virB5*, detectaram o DNA de *Brucella* spp. no sangue de veados-campeiros (9/44) na mesma região do presente trabalho.

A prevalência de 5% obtida nos veados-campeiros pelo diagnóstico molecular de *Brucella* spp. foi a metade do obtido na sorologia pelo AAT, porém é muito próxima da obtida pelo 2-ME, havendo um cervídeo positivo para todos os testes, dois cervídeos positivos somente para a PCR e dois positivos apenas no 2-ME. O que pode significar a diferente exposição dos animais ao agente infeccioso.

Nos bovinos o teste estatístico não foi significativo, demonstrando que não há maior proporção de bovinos positivos sororeagentes (25/132) em comparação com os bovinos positivos na PCR B4/B5 (20/132). A vantagem da associação dos testes sorológicos e a PCR B4/B5 é a complementaridade dos testes em detectar a presença ou o contato do animal com *Brucella* spp. em diferentes estágios da doença, possibilitando a detecção de um maior número de animais.

A detecção de animais sororeagentes é devido ao contato dos animais com o patógeno e a característica da brucelose em ser uma doença crônica nos bovinos, levando a produção de anticorpos reagentes. Já a PCR detecta a presença do DNA bacteriano nos momentos iniciais da infecção, antes do aparecimento de anticorpos reagentes, ou seja, durante a fase de janela imunológica ou quando a bactéria está presente no sangue do animal.

Nove bovinos e um cervídeo que foram positivos somente para a PCR B4/B5, provavelmente não tinham títulos suficientes de anticorpos detectáveis, possivelmente estes animais estavam no início do estágio da infecção levando a diminuição da

sensibilidade dos testes sorológicos, com a ocorrência de reações falso negativas ou reações fracas positivas (Schmoock et al. 2011). Isto ocorre porque no início da resposta imune humoral, após a exposição à bactéria, a resposta sorológica é dada pela produção de anticorpos do isotipo IgM e logo depois pela produção de IgG1, que é a principal imunoglobulina para o diagnóstico sorológico (Brasil 2006; Butler et al. 1986).

As bactérias do gênero *Brucella* apresentam vários hospedeiros, com isso o desenvolvimento de programas no controle e vigilância epidemiológica deve obrigatoriamente contemplar ambas as espécies domésticas e selvagens (Muma et al., 2011). E como a região do Pantanal possui grande riqueza e abundância de espécies de mamíferos habitando a planície, principalmente quando presentes algumas espécies do gênero *Brucella* bem adaptadas em ungulados e extremamente difícil de levar a erradicação (Bienen & Tabor 2006). No Pantanal, devido à sazonalidade climática, os ambientes geram fatores de risco para a transmissão da doença devido ao agrupamento de animais em locais secos na época das cheias ou a concentração de animais nos reservatórios de água na seca.

Uma investigação epidemiológica detalhada, com a caracterização molecular das espécies e biótipos de *Brucella* presentes em bovinos e cervídeos da área estudada pode auxiliar. Galey et al. (2005) descrevem que na região de Wyoming e Idaho transmissões de *Brucella* sp. do *Cervus canadensis* para os bovinos tem ocorrido e a utilização de testes no DNA apresentou uma identidade genética de 99% nos isolados de *Brucella* sp. dos cervídeos e dos bovinos.

As taxas de soroprevalência indicam um menor contato do veado-campeiro com o agente estudado, diferente do bovino que apresentou um percentual muito maior de animais positivos. Por serem consideradas espécies simpátricas o bovino pode estar

desempenhando um papel importante na transmissão para o veado-campeiro. Segundo Godfroid (2002), a brucelose em ungulados selvagens aparentemente resulta de um *spillover* dos animais reservatórios presentes em animais de produção. Muma et al. (2011) sugeriram que a brucelose no antílope *Kobus leche* é proveniente dos bovinos domésticos, que se introduzidos na área de vida deste antílope, leva a infecção do mesmos.

Portanto, os resultados deste estudo indicam que a *Brucella* ssp. circula no ambiente do Pantanal Sul-Mato-Grossense entre os veados-campeiros e bovinos em simpatria. Podendo ser um risco tanto para a produtividade da pecuária quanto para a biodiversidade local e deve ser tratada com políticas epidemiológicas diferenciadas para a região do Pantanal.

REFERÊNCIAS

- Aguirre AA, Hansena ED, Starkeyb EE, Mclean RG. 1995. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Preventive Veterinary Medicine* 21:313-322.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. *Institut National de la Recherche Agronomique*, Paris, France, 175pp.
- Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. 2003. Laboratory-based diagnosis of brucellosis—A review of the literature. Part II: Serological tests for brucellosis. *Clinical Laboratory* 49: 577–589.
- Araújo FR, Ramos CAN, Luíz HL, Shabib Pérez IAHF, Oliveira RHM, De Souza IIF, Russi LDS. 2009. Avaliação de um protocolo de Extração de DNA genômico a partir de sangue total. *Comunicado Técnico* 120. 1-5.
- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 95:271-275.
- Beja-Pereira A, Bricker B, Chen S, Almendra C, White PG, Luikart G. 2009. DNA genotyping suggests that recent brucellosis outbreaks in the Greater Yellowstone Area originated from elk. *J Wildl Dis.* 45(4):1174-7.
- Bengis RG, Kock RA, Fischer. 2002. J. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Rev Sci Tech.* 21: 53-65.
- Bienen L, Tabor G. 2006. Applying an ecosystem approach to brucellosis control: can an old conflict between wildlife and agriculture be successfully managed?. *From Ecol Environ.* 4:6:319-327.
- Brasil. 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, Brasília, 192pp.
- Butler J, Seawright G, McGivern P, Gilsdorf M. 1986. Preliminary evidence for a diagnostic immunoglobulin G1 antibody response among culture-positive cows

vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 and challenge exposed with strain 2308. *Am J Vet Res.* 47:1258-1264.

Cardoso EL, Crispim SMA, Rodrigues CAG, Barioni W. 2000a. Biomassa aérea e produção primária do estrato herbáceo em campo de *Elyonurus muticus* submetido à queima anual, Pantanal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* Brasília. 35: 1501-1507.

Cardoso EL, Crispim SMA, Rodrigues CAG, Barioni W. 2000b. Composição e dinâmica da biomassa aérea após a queima em savana gramíneo-lenhosa no Pantanal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* Brasília. 35: 2309-2316.

Cardoso EL, Crispim SMA, Rodrigues, CAG, Barioni WJ. 2003. Efeitos da queima na dinâmica da biomassa aérea de um campo nativo no Pantanal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 38: 747-752.

Chate SC, Dias RA, Amaku M, Ferreira F, Moraes GM, Costa Neto AA, Monteiro LARC, Lôbo JR, Figueiredo VCF, Gonçalves VSP, Ferreira Neto JS. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 61:46-55.

Corbel, MJ. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis.* 3:213-21.

Crawford RP, Adams LG, Richardson BE. 1990. Effect of dose of *Brucella abortus* strain 19 in yearling heifers on the relative risk of developing brucellosis from challenge exposure with strain 2308. *Am J Vet Res.* 51:11:1837-40. ISSN 0002-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122782> >.

Davis DS, Templeton JW, Ficht TA, Williams JD, Kopec JD, Adams LG. 1990. *Brucella abortus* in captive bison . I. Serology, bacteriology, pathogenesis, and transmission to cattle. *J Wild Dis.* 26:360-371.

Desbiez ALJ, Bodmer RE, Tomas WM. 2009. Mammalian Densities in a Neotropical Wetland Subject to Extreme Climatic Events. *Biotropica.* 1-7.

- Duarte JMB, González S. 2010. Neotropical Cervidology: *Biology and medicine of Latin American deer*. Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland: IUCN. 393.
- Elisei C, Pellegrin A, Tomas WM, Soares CO, Araújo FR, Funes-Huacca ME, Rosinha GMS. 2010. Evidência molecular de *Brucella* sp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30:503-509.
- Galey F, Bousman J, Cleveland T et al. 2005. Wyoming Brucellosis Coordination Team report and recommendations. Report presented to Governor Dave Freudenthal. Cheyenne, WY: Wyoming Brucellosis Coordination Team.
- Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech*. 21:277-86. ISSN 0253-1933.
- Hinić V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R, Abril C. 2009. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. In wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Vet Res*. 5:1-8.
- Jackson JE. 1987. *Ozotoceros bezoarticus*. *Mammalian Species*. 295:1-5.
- Junk WJ & Silva CJ. 1999. O conceito do pulso de inundação e suas implicações para o Pantanal de Mato Grosso. In: Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal, 2., 1996, Corumbá. Manejo e Conservação. *Anais. Brasília-SPI*. 17-28.
- Lacerda ACR. 2008. *Ecologia e estrutura social do veado-campeiro (Ozotoceros bezoarticus) no Pantanal*. Doutorado Thesis, UnB, Brasília (DF), 194pp.
- Mathias LA, Girio RJS, Duarte JMB. 1999. Serosurvey for Antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in Pampas Deer from Brazil. *Journal of Wildlife Disease*. 35:112-114.
- Merino ML, González S, Leeuwenberg F, Rodrigues FHG, Pinder L, Tomás W. 1997. Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus 1758): distribuição, história natural, ecologia e conservação. Duarte, editor. *Biologia e Conservação dos Cervídeos Sul-Americanos*. FUNEP, Jaboticabal, Brasil. 43-58.
- Miyashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME. 2007. Detection of *Brucella Abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo

- and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction. *Braz J of Micro.* 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 JB, Godfroid J, Samui KL, Skjerve E. 2007. The role of Brucella infection in abortions among traditional cattle reared in proximity to wildlife on the Kafue flats of Zambia. *Rev Sci Tech.* 26: 721-730.
- Muma JB, Munyeme M, Matope G, Siamudaala VM, Munangádu HM, Matandiko W, Godfroid J, Skjerve E, Tryland M. 2011. Brucella seroprevalence of the Kafue lechwe (*Kobus lechwe kafuensis*) and Black lechwe (*Kobus lechwe smithemani*): Exposure associated to contact with cattle. *Preventive Veterinary Medicine.* 100:256-260.
- Nicoletti P. 1992. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Tropical Animal Health and Production.* 24:40-44.
- Paulin LM, Ferreira Neto JS. 2002. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. *Arq Inst Biol.* 69:105-112.
- Pellegrin AO, Leite RMH, Sereno JRB, Lage AP, Leite PC, Leite RC, Ravaglia E. 2006. Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares Comunicado Técnico 58, Corumbá, 1-4.
- Santos SA. 2002. Aspectos Agro e Zoológicos. In: *Sistema de produção de gado de corte do Pantanal*, Embrapa Pantanal, Corumbá, 14-17.
- Schmoock G, Ehricht R, Melzer F, Elshner M, Tomaso H, Neubauer H, Al Dahouk S. 2011. Development of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect and differentiate *Brucella* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* Article in press 1-13.

ANEXO

2-ME SAL	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	-								
25 I	-	-							
25	-	-	+						
50 I	-	-	+	+					
50	-	-	+	+	+				
100 I	-	-	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200 I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

+ : positivo
 - : negativo
 Inc : reação inconclusiva
 □ : combinação que não pode ocorrer

2-ME : 2-Mercaptoetanol
 SAL : soroaglutinação lenta
 NR : não reagente
 I : reação incompleta

Quadro 1 – Interpretação da prova do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses e vacinadas entre 3 e 8 meses de idade (Brasil, 2009)

2-ME SAL	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	–								
25 I	–	–							
25	–	–	+						
50 I	–	–	+	+					
50	Inc	Inc	+	+	+				
100 I	Inc	Inc	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200 I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

+ : positivo
 – : negativo
 Inc : reação inconclusiva
 □ : combinação que não pode ocorrer

2-ME : 2-Mercaptoetanol
 SAL : soroaglutinação lenta
 NR : não reagente
 I : reação incompleta

Quadro 2 – Interpretação da prova do 2-ME para fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a 8 meses (Brasil, 2009)