

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**

**PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES PORTADORES DE *Brucella*  
spp NO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**

**SURVEY OF WILD ANIMALS CARRIERS OF *Brucella* spp IN THE  
PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**

**EDUARDO MIGUÉIS CORRÊA**

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL- BRASIL  
MAIO DE 2010

**Eduardo Miguéis Correa**

"Identificação de mamíferos silvestres do Pantanal sul-mato-grossense portadores de *Bruceia* spp."

"Survey of wild mammals of Pantanal Sul-mato-grossense carriers for *Bruceia* spp."

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.

Área concentração: Sanidade Animal

APROVADA: 17/05/2010

Dra. Aíesca Oliveira Pellegrin

Orientadora

Dra. Carina Elisei de Oliveira

Dr. Heitor Miraglia Herrera

**EDUARDO MIGUÉIS CORRÊA**

**IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES PORTADORES DE *Brucella*  
spp NO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**

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

Orientadora: Aiesca Oliveira Pellegrin

Co-orientadora: Grácia Maria Soares  
Rosinha

APROVADO:

---

Prof. Dra. Aiesca Oliveira  
Pellegrin

Orientadora

---

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira

---

Dr. Heitor Miraglia Herrera

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
2010

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família. Sou eternamente grato aos meus pais Domingos e Julieta, pelo incentivo e apoio incondicional em todos os momentos.

Agradeço aos meus irmãos e aos meus amigos pelo companheirismo e os bons momentos

A Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin, minha orientadora, por ter me ajudado a compreender princípios da epidemiologia de doenças infecciosas e possibilitar o desenvolvimento deste estudo, permitindo meu aprimoramento como profissional em Medicina Veterinária Preventiva

A Dra. Carina Elisei de Oliveira agradeço pela atenção e pela ajuda com a construção da árvore genética para análise filogenética, além de sempre estar à disposição para esclarecimentos sobre as técnicas da Biologia Molecular

A Dra. Grácia Maria Soares Rosinha, por permitir o uso do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte além de ser minha co-orientadora neste estudo. Obrigada pela disponibilidade em me tirar dúvidas e dar sugestões.

Ao Renato Henrique Marçal de Oliveira, técnico do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte, agradeço pela ajuda no sequenciamento das minhas amostras e por sempre estar disposto a ajudar e tirar dúvidas

Agradeço em especial à Bárbara Guimarães Csordas, companheira de todos os momentos que sempre esteve disposta a ajudar

A Embrapa Gado de Corte pelo suporte nas atividades laboratoriais e a Embrapa Pantanal pelo suporte as atividades de coleta do material utilizado na dissertação.

A CAPES pela concessão do apoio financeiro para a realização do curso de Mestrado.

A todos os colegas do laboratório, que de uma forma ou de outra sem eles o laboratório não funcionaria, sem a cooperação de todos seria muito difícil a realização deste trabalho. E a todas as pessoas, que embora anônimas, participaram de alguma forma na construção desta dissertação, seja direta ou indiretamente. Tenham certeza de que foram muito importantes para mim e que jamais serão esquecidas.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2 ME	2 Mercaptoetanol
AC	Anticorpo
AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
BCV	Vacúolo Contendo Brucella
C.D.	Células dendríticas
DNA	Acido Desoxirribonucléico
E.U.A	Estados Unidos da America
ELISA	Enzime linked immunoassay
ha	Hectare
Ig-G	Imunoglobulina G
Ig-M	Imunoglobulina M
IS	Inserção de Sequência
LPS	Lipopolissacarídeos
ME	Mínima evolução
mg	Miligrama
µl	Microlitro
mL	Mililitro
µM	Milimolar
Mm	Milímetro
Ng	Nanograma
NJ	Neighbour-Joining
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
PAL	Prova do Anel do Leite
PB	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PrPc	Príon celular
RE	Retículo Endoplasmático
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RFC	Reação de Fixação do Complemento
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SST4	Sistema secreção tipo IV
TGF β1	Transforming growth factor
V	Volts

### LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- |          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Transmissão de <i>Brucella</i> spp. entre diferentes hospedeiros. ADAPTADO (ALTON, FORSYTH, 1996).  | 19 |
| Figura 2 | Localização preferencial de <i>Brucella</i> spp. (A) Placenta, cotilédones do útero gravídico bovino ( <a href="http://www.limousin.com.br/pages/artigos/vendo.asp">HTTP://www.limousin.com.br/pages/artigos/vendo.asp</a> ). (B) Disseminação pelo sistema retículo endotelial, linfonodos regionais. ( <a href="http://www.mcguido.vet.br/linfonodos_vaca">HTTP://www.mcguido.vet.br/linfonodos_vaca</a> ). | 22 |

### LISTA DE FIGURAS ARTIGO

- |          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Perfil eletroforético da PCR utilizando um primer Virb5 de <i>Brucella</i> spp. Nas amostras 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 foi possível visualizar uma banda de 500 pb referente ao gene virb 5 de <i>Brucella</i> spp. MM: massa molecular, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo.                                       | 56 |
| Figura 2 | Filogenia de <i>Brucella</i> spp construída a partir do alinhamento de sequências parciais do gene <i>virb</i> 5. Método utilizado para a construção da árvore filogenética foi o de Neighbour-Joining programa (MEGA 3.1). O suporte para cada clado foi determinado por 1000 <i>bootsprap</i> indicando o valor dos nós internos (%). | 57 |

**LISTA DE TABELAS E QUADROS ARTIGO**

Tabela 1	Número de acesso no <i>GenBank</i> de <i>Brucella</i> spp. correspondente, utilizada para a construção da árvore filogenética para análise parcial do gene <i>virB5</i>	55
Tabela 2	Frequência de animais positivos na PCR entre as espécies estudadas, utilizando <i>primer</i> do gene <i>virb 5</i> de <i>Brucella</i> spp..	56

## RESUMO

CORREA, E.M. **LEVANTAMENTO DE ANIMAIS SILVESTRES PORTADORES DE *Brucella* spp NO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**. Brasil. 2010. 65p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A brucelose é uma antropozoonose de distribuição mundial, causada por bactérias coccobacillus gram-negativos, do gênero *Brucella* que infectam diversas espécies animais, domésticos e silvestres, bem como o homem. Neste trabalho foram analisadas amostras de sangue de sete espécies de mamíferos silvestres, coletadas em propriedades localizadas na sub-região da Nhecolândia, no Pantanal brasileiro, por meio do ensaio da polimerase em cadeia. Foram obtidos resultados positivos para a pesquisa do gene *virB5* de *Brucella* spp. em 7,1% (1/14) das amostras de *Thrichomys pachyurus* (saiiá), em 34% (11/32) *Nasua nasua* (quati), 24% (15/61) de *Ozotocerus bezoarticus* (veado campeiro), 12% (3/25) de *Cerdocyon thous* (lobinho), 50% (1/2) de *Euphractus sexcintus* (tatu-peba) e em 67% (2/3) de *Leopardus pardalis* (jaguatirica). Estes resultados indicam que as espécies estudadas podem ser infectadas por espécies de *Brucella* presente em populações de animais do Pantanal e o impacto da brucelose nos animais silvestres, assim como a importância destes animais na cadeia epidemiológica da brucelose necessitam ser melhor avaliadas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose, Animais Silvestres, Pantanal, PCR.

## ABSTRACT

CORREA, E.M. SURVEY OF WILD ANIMALS CARRIERS OF *Brucella spp* IN THE PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE. Brasil. 2010. 65p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Brucellosis is an anthroponosis with worldwide distribution, caused by gram-negative bacteria coccobacillus. The genus *Brucella* infects different animal species, wild and domestic, as well as humans. This study analyzed blood samples of seven species of wild mammals, collected from properties located in the sub-region Nhecolândia in the Brazilian Pantanal, using the polymerase chain reaction assay. Positive results were obtained for the research of gene *virB5* *Brucella* spp. 7.1% (1 / 14) samples of *Thrichomys pachyurus* (Saiuíá) in 34% (11/32) *Nasua nasua* (coati), 24% (15/61) of *Ozotocerus bezoarticus* (pampas deer), 12% (3 / 25) of *Cerdocyon thous* (cub), 50% (1/2) and 67% (2/3) of *Leopardus pardalis* (Ocelot). These results indicate that these species can be infected by *Brucella* species present in animal populations of wetland and the impact of brucellosis in wildlife as the importance of these animals in the brucelose epidemiologic chain needs to be better evaluated.

INDEXING TERMS: Brucellosis, wildlife, Pantanal, PCR

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Brucelose	14
2.2 O agente etiológico da brucelose	16
2.3 Patogenia	18
2.4 Epidemiologia	23
2.5 Diagnóstico	27
2.5.1 Diagnostico indireto	27
2.5.1.1 Teste do Antígeno acidificado tamponado (AAT)	28
2.5.1.3 Teste do 2-Mercaptoetanol	28
2.5.1.4 Reação de Fixação do Complemento	28
2.5.1.5 Testes de Imunoadsorção enzimática (ELISA)	29
2.5.1.6 Prova do anel do leite (PAL)	29
2.5.2 Diagnóstico Direto	30
2.5.2.1 Cultura bacteriana	30
2.5.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31
2.6 Pantanal	32
2.6.1 Mamíferos Silvestres	33
2.6.2 Brucelose no Pantanal	35
REFERÊNCIAS	37
ARTIGO	48
INTRODUÇÃO	51
MATERIAIS E MÉTODOS	52
1. Amostras para identificação de reservatórios silvestres.	52
2. Extração do DNA genômico	53
3. Escolha dos genes para <i>Brucella</i> spp e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	53
4. Sequenciamento	54
5. Análise Filogenética	54
RESULTADOS	55

DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

## 1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma antropozoonose de distribuição mundial, causada por bactérias coccobacillus gram-negativos, do gênero *Brucella* que infectam diversas espécies animais e humanos (NICOLETTI, 2002; WHATARAI, 2006). Está entre as doenças de maior ocorrência, causadora de prejuízos econômicos e impactos nos sistemas de saúde pública em todo o mundo (CUTLER et al., 2005). Desde sua identificação, a doença foi muito importante na formação de alguns conceitos de zoonose, tendo sido a *Brucella abortus* o primeiro agente a ter sua forma de transmissão pelo leite conhecida, observação que foi muito importante na implementação de medidas sanitárias como a pasteurização do leite (WYATT, 2005).

A incidência da brucelose em humanos esta amplamente ligada à prevalência da infecção em ovinos, caprinos, suínos e bovinos e às práticas ocupacionais que permitam a exposição dos humanos aos animais e seus produtos (HOOVER, FRIEDLANDER, 1997). A brucelose vem sendo amplamente debatida devido a aspectos de sua epidemiologia, principalmente após relatos de ocorrência dentre animais silvestres com potencial para continuamente transmitir o organismo aos animais domesticados (PAPPAS, PAPANIMITRIOUS, 2007). A variedade de animais silvestres que podem ser infectados por *Brucella* spp. é ampla. A bactéria tem sido isolada em Bisão (*Bison bison*), alce (*Cervus elaphus*), Suínos selvagens (*Sus scrofa feral*), raposas (*Vulpes vulpes*), lebres (*Lepus capensis*), búfalo Africano (*Syncerus caffer*), renas (*Rangifer tarandus tarandus*), caribu (*Rangifer tarandus groelandicus*), cabras montesas (*Rupicapra rubicapra*) e o Ibex (*Capra ibex*), e devem ser considerados como possíveis reservatórios selvagens (GODFROID et al., 2005).

A brucelose está presente em todo o território brasileiro, apesar de sua prevalência ser, na maioria das vezes, baixa. No Mato-Grosso do Sul, a prevalência de bovinos soro reagentes estimada em 1998 foi de 6,3%, semelhante à de 1975 no antigo Estado do Mato-Grosso. Em Minas Gerais passou de 7,6% em 1975, para 6,7% em 1980. No Paraná a prevalência estimada em 1975 foi de 9,6%, passando para 4,6% em 1989. Os dados oficiais, publicados no Boletim de Defesa Sanitária Animal, mostram que a prevalência de animais positivos no Brasil se manteve entre 4% e 5% no período entre 1988 e 1998 (POESTER et al., 2002). No Estado do Mato Grosso do Sul, em estudos conduzidos no Pantanal por PELLEGRIN et al. (1999), foram encontrados 6,9% e 2% reprodutores e matrizes positivos, respectivamente.

MONTEIRO et al. (2006) estimaram uma prevalência real de 5,6%, com 37,3% dos rebanhos positivos. As variáveis que apresentaram associação com a soropositividade à brucelose foram: o tipo de exploração corte, a raça zebu, detecção de aborto na propriedade, existência de áreas alagadiças na propriedade e o ingresso de animais nos rebanhos. Concluindo que além da brucelose ser prevalente no estrato estudado no estado de Mato Grosso do Sul, o controle da doença consiste na adoção de programa com especial atenção à exploração do tipo corte, à raça zebu e à presença do aborto. Embora sejam poucos os trabalhos referentes aos impactos econômicos da doença decorrentes dos abortamentos e períodos de esterilidade temporária, responsáveis pela redução do desempenho reprodutivo dos rebanhos e baixa produção de leite, no Brasil, os prejuízos econômicos ocasionados pela brucelose bovina ou bubalina foram estimados, em 1971 pelo MAPA, em US\$ 32 milhões de perdas anuais, considerando somente os abortos e a queda na produção leiteira (POESTER et al., 2002).

O Pantanal é reconhecido como Patrimônio Nacional e designado pela UNESCO como Reserva da Biosfera, de grande significância global. Atualmente, existe uma tendência de substituição da pecuária extensiva tradicional por sistemas mais intensivos, acompanhada do desmatamento para implantação de pastagem cultivada e degradação de cursos de água o que poderá ameaçar o frágil equilíbrio do ecossistema da região (MAURO et al., 2002). Alterações no ambiente podem modificar a dinâmica de várias doenças, inclusive da brucelose, por introdução de fatores de risco relacionados ao manejo dos animais, quando da intensificação do sistema de produção. O atual aumento na incidência da brucelose pode ser atribuído a modificações nos sistemas de criação, alterações ecológicas e de uso da terra além da ocorrência, cada vez mais comum, de interações entre rebanhos domésticos e vida selvagem (MENEGHI, 2006). A frequência de ocorrência das várias infecções que acometem tanto espécies silvestres como domésticas, assim como a virulência dos parasitas e microorganismos, e os conseqüentes impactos desses sobre a saúde animal, podem se modificar de acordo com as condições ambientais e com a utilização da paisagem pelo homem. Este fenômeno representa um risco à saúde pública, aos animais de criação, e a varias espécies de hospedeiros silvestres, com distribuição restrita ou que possuem pequenas populações. Por outro lado, doenças que acometem ambas as populações na maioria das vezes só podem ser controladas nas espécies domésticas, geralmente pela imunização de animais susceptíveis, beneficiando também as populações silvestres por interferirem no ciclo de transmissão da(s) doença (s).

O objetivo deste trabalho foi identificar por meio do ensaio da polimerase em cadeia a presença de mamíferos silvestres portadores pela *Brucella* spp. na sub-região da Nhecolândia do Pantanal Mato-Grossense.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Brucelose

A brucelose é reconhecida atualmente como uma das mais importantes zoonoses bacterianas, entre as de maior ocorrência, causadora de prejuízos econômicos e impactos nos sistemas de saúde pública em todo o globo (CUTLER et al., 2005), sendo inclusive, um patógeno comumente lembrado como agente de uma possível arma biológica (ASM, 2004; HOOVER, FRIDLANDER, 1997). A doença provavelmente tem molestado o homem desde a antiguidade, surgindo no momento em que povos primitivos desenvolveram a cultura de domesticar animais, explorando diversas características da criação para alimentação. Indícios mais antigos da brucelose datam mais de 2.000 anos (GORVEL, 2008). Análises de lesões osteoarticulares compatíveis com brucelose em esqueletos egípcios antigos datados em 750 a.C. demonstrou que há possibilidade que a doença tenha sido o que ficou conhecida como a 5ª praga do Egito (PAPPAS, PAPADIMITRIOUS, 2007).

Fontes escritas revelam que ovinos e caprinos foram os primeiros animais domesticados no Império Romano, o leite, além de consumido cru, era utilizado no preparo de queijos que, na época, foram implicados como fonte de infecção de uma doença que seria transmitida pelo alimento. Esta hipótese pôde ser confirmada por CAPASSO (2002), que detectou organismos do tipo cocos, compatíveis com os do gênero *Brucella*, em queijos carbonizados, e encontrou lesões típicas de brucelose em esqueletos humanos mortos durante a primeira erupção do Monte Vesúvio em 79 d.c. próximo a cidade romana de Herculaneum, esta mesma doença ficou conhecida posteriormente como Febre de Malta e atualmente como Brucelose (CUTLER et al., 2005; GODFROID et al., 2005).

Em 1887, David Bruce relatou suas primeiras impressões sobre uma doença endêmica na Ilha de Malta, conhecida como Febre de Malta ou Febre do Mediterrâneo, causada por uma espécie minúscula de parasita, o recém descoberto *Micrococcus mellitensis*. Na maioria dos casos humanos, a descrição dos relatos incluía estado febril remitente e intermitente, fadiga, aumento do baço e algumas vezes inchaço das articulações e dores articulares (NIELSEN & DUNCAN, 1990). Em menos de uma década depois, em 1897, Benhard Bang isolou o agente causativo do Aborto Infecioso Bovino, conhecido posteriormente como Bacilo do Aborto ou de Bang (SELEEN et al., 2009; HOOVER, FRIEDLANDER, 1997). Mas foi Alice Evans,

uma cientista americana, quem confirmou a relação entre a Doença de Bang e a Febre de Malta, renomeando o organismo como *Brucella mellitensis*, em honra a David Bruce (SELEEN et al., 2009). Em 1905, aconteceu o que viria a ser um dos maiores avanços na área da Epidemiologia. Themistocles Zammit, um médico maltês, examinou seis animais da espécie caprina que reagiram ao teste sanguíneo para Brucelose, percebeu que os animais infectados secretavam a bactéria através do leite e relacionou os casos com fazendeiros que adquiriam a doença, provando que os animais poderiam ser a fonte de infecção para seres humanos, a partir desta descoberta criou-se o processo de pasteurização do leite (WYATT, 2005).

A Brucelose humana sempre esteve associada a um reservatório animal, o organismo infecta principalmente animais domésticos e selvagens, causando abortamentos, morte fetal e infecção genital. Humanos são afetados acidentalmente por contato com os animais infectados (GODFROID et al., 2005; HOOVER, FRIEDLANDER, 1997). As espécies clássicas do gênero *Brucella* apresentam comportamento epidemiológico distinto e de acordo com o hospedeiro animal preferido, foram classificadas em *Brucella abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. mellitensis* (caprinos), *B. canis* (cães), *B. ovis* (ovinos) e *B. neotomae* (roedores), o que atualmente, sabe-se, não significa uma predileção absoluta (GODFROID et al., 2005; HOOVER, FRIEDLANDER, 1997).

Embora a brucelose bovina tenha sido erradicada em países desenvolvidos como Austrália, Nova Zelândia, Japão, E.U.A. e Canadá, ela permanece como um problema incontrollável em regiões de países subdesenvolvidos como África, regiões do Mediterrâneo, partes da Ásia e America Latina e regiões pobres da Europa onde é altamente endêmica (GUL, KHAN, 2007; PAPPAS, PAPADIMITRIOUS, 2007) sendo sinônimo de baixo status socioeconômico (PAPPAS, PAPADIMITRIOUS, 2007). Estima-se 500.000 novos casos ao ano (TZANEVA et al., 2009) e que 2.4 bilhões de pessoas estejam em risco em 86 países afetados (WHO, 2003). A *Brucella mellitensis*, espécie mais virulenta do gênero, provou ser de difícil eliminação, mesmo após um século de sua descoberta nenhum país conseguiu sua erradicação (NICOLLETI, 2002).

No Brasil, país que abriga o maior rebanho bovino comercial do mundo, um dos principais problemas na criação está relacionado à brucelose bovina, causada pela infecção por *Brucella abortus*, com prevalências indo de 2,5% a 7,5%, refletindo as diferenças nos sistemas de criação, devido às condições geográficas, econômicas e sociais de cada região

(POESTER, 2002).

A incidência em humanos está amplamente ligada à prevalência da infecção em ovinos, caprinos, suínos e bovinos, e as práticas ocupacionais que permitem a exposição dos humanos aos animais e seus produtos (HOOVER, FRIEDLANDER, 1997). Aspectos relacionados à epidemiologia da brucelose tem sido continuamente estudados, com o reconhecimento de novas cepas entre Cetáceos e Pinípedes, cuja natureza zoonótica e distribuição vem sendo descritas (OHISHI et al., 2004; GODFROID et al., 2005; TRYLAND et al., 2005; DAGLEISH et al., 2008). A *Brucella* spp. tem sido isolada de várias espécies de animais silvestres como o bisão (*Bison bison*), alce (*Cervus elaphus*), suínos selvagens (*Sus scrofa* feral), raposas (*Vulpes vulpes*), lebres (*Lepus capensis*), búfalo Aricano (*Syncerus caffer*), renas (*Rangifer tarandus tarandus*), caribu (*Rangifer tarandus groelandicus*), cabras montesas (*Rupicapra rubicapra*) e o ibex (*Capra ibex*) e estes animais devem ser considerados como reservatórios selvagens (GODFROID et al., 2005).

## 2.2 O agente etiológico da brucelose

*Brucella* spp. são coccobacilos gram-negativos aeróbicos, intracelular facultativos, não esporulantes, não toxigênicos, e apesar de serem imóveis (HOOVER, FRIEDLANDER, 1997; SELEEN et al., 2009) apresentam todos os genes responsáveis por mobilidade, com exceção do sistema quimiotático necessário para se ter um flagelo funcional (SELEEN et al., 2009). Filogeneticamente pertencem ao grupo Rhizobiaceae, sub-classe das  $\alpha$ -2 Proteobacterias e são relacionadas mais intimamente com diversas espécies de bactérias intracelulares que vivem em associação com células eucarióticas animais ou de plantas (MORENO et al., 2002; CLOECKAERT, VISCAÍNO, 2004; PAPPAS, PAPADIMITRIOUS, 2007).

Existem atualmente nove espécies dentro do gênero *Brucella*, *Brucella abortus*, *B. mellitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, e as espécies recém-descobertas, *B. microti* em pequenos roedores e *B. ceti* e *B. Pinnipedialis* isoladas a partir de mamíferos marinhos (FOSTER et al., 2008; SELEEN et al., 2009). As três primeiras são reconhecidas como clássicas e dentro destas, sete biovars são reconhecidos para *B. abortus*, três para *B. mellitensis* e cinco para *B. suis* (SELEEN et al., 2009), diferenciadas por testes baseados em caracterização fenotípica, sorotipo, tipo de fago, requerimento de CO<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S e propriedades metabólicas (CLOECKAERT, VISCAÍNO, 2004).

No mundo inteiro, as espécies mais patogênicas para animais domésticos e humanos, em ordem de importância, são: *B. mellitensis*, principal agente da brucelose de pequenos ruminantes; *B. abortus*, responsável pela brucelose bovina e *B. suis*, responsável pela brucelose suína. Estas espécies podem causar abortamento e doença debilitante em seus hospedeiros e podem ser responsáveis, quando presentes em um rebanho, região ou país, por restrições a movimentação dos animais e financeira causando enormes perdas econômicas (GODFROID et al., 2005). Pertencem ao grupo antigênico de fenótipo liso que caracteristicamente apresentam em sua membrana citoplasmática uma cadeia de lipopolissacarídeo (LPS) completo, formada por uma porção antigênica cadeia O, lipídio A, e o núcleo oligossacarídeo (SELEEN et al., 2009), ao lado de *B. canis*, são as únicas espécies descritas que podem causar doença em uma diversidade de mamíferos e no homem (HOOVER, FRIEDLANDER, 1997).

*Brucella canis* e *B. ovis* são as únicas espécies do gênero a apresentarem fenótipo rugoso naturalmente, não contendo a porção antigênica-O do LPS (SELEEN et al., 2009).

Atualmente diversas técnicas de genotipagem molecular tem sido úteis nas definições em relação à taxonomia de *Brucella*. Em um primeiro momento, estudos de hibridização de DNA-DNA revelaram alto grau de homologia (>90%) entre os genomas das seis espécies de *Brucella* reconhecidas e entre as últimas e recentes cepas isoladas de mamíferos marinhos, o que levantou uma discussão e gerou controvérsia quanto à classificação do gênero. Alguns autores defendem que as espécies de *Brucella* devam ser agrupadas como biovars de uma única espécie, a *B. mellitensis* (CLOECKAERT et al., 2002; FOSTER et al., 2002). Por meio de outras técnicas moleculares, como análise de fragmentos de restrição (do inglês “*Restriction fragment length polymorphism*”- RFLP) e análise de inserção de sequências (IS), foram identificados polimorfismos em certas regiões do genoma, indicando variabilidade no DNA e na organização cromossômica dentro do gênero. Entre os genomas completos de *Brucella* spp seqüenciados, todos apresentam dois cromossomos circulares com em média 2.1 Mb (milhões de pares de base) pares de base (cromossomo I) e 1.2 Mb (cromossomo II). O número total de genes por genoma é 3.460 sendo similar entre todos os nove genomas estudados de *Brucella* spp. (CLOECKAERT, VISCAÍNO, 2004; WATTAM et al., 2009). Apesar da extensa similaridade, foram identificadas dezenas de regiões de DNA específico tanto em *B. mellitensis* 16M quanto em *B. suis* 1330, que podem contar para as diferenças de patogenicidade e preferência por hospedeiro encontrada entre as duas espécies

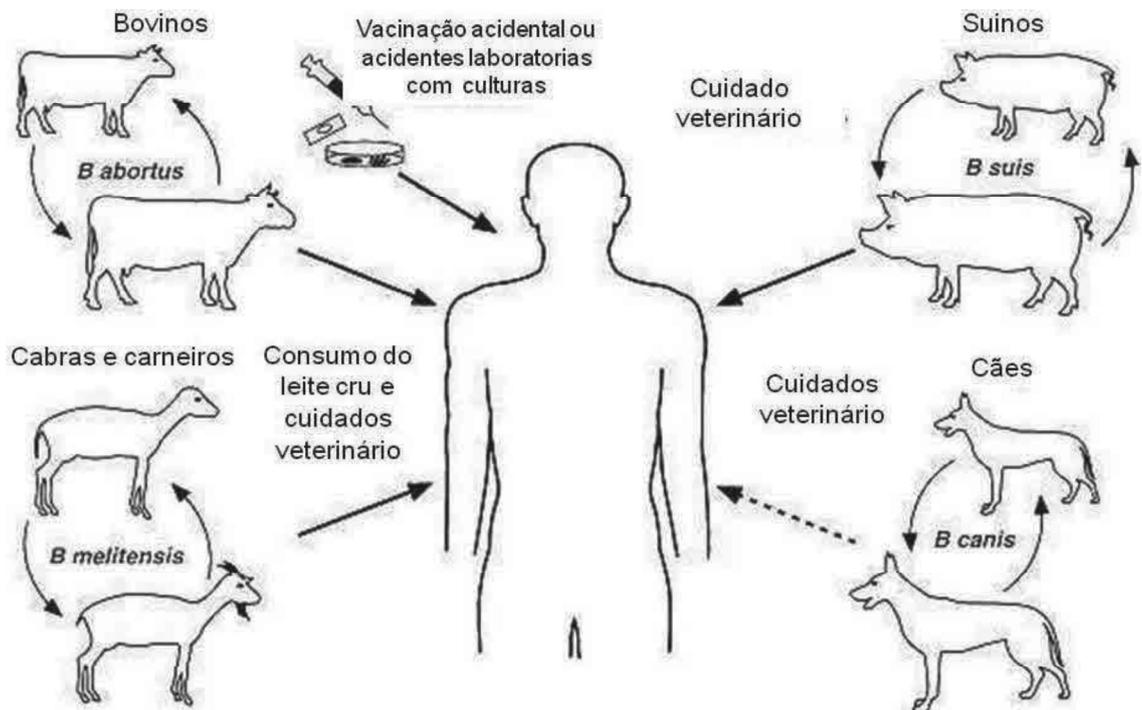
(CLOECKAERT, VISCAÍNO, 2004).

Inserção de sequências (IS) móveis, distribuídas ao longo de um genoma são comumente consideradas fontes de identificação de polimorfismo dentro de uma espécie bacteriana. No gênero *Brucella* foi identificado a presença deste elemento, o IS711 ou IS6501, adjacente ao gene codificante da proteína imunogênica BCSP31. A análise destas sequências forneceu padrões de perfis eletroforéticos (fingerprinting) de hibridização e diferenças no número de cópias deste elemento de forma específica para cada cepa e biovar (CLOECKAERT, VISCAÍNO, 2004), representando a diversidade interna da espécie. Também houveram descobertas de outros marcadores moleculares para *B. mellitensis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae* (MORENO *et al.*, 2002) e para as espécies marinhas, *B. pinnipediae* e *B. cetaceae* (FOSTER *et al.*, 2002). Foram identificadas fontes de polimorfismo de DNA em genes codificantes de antígenos de superfície da bactéria, como nos genes *omp25*, *omp31*, *omp2a* e *omp2b*, responsáveis por antígenos protéicos da membrana celular, permitindo diferenciação entre espécies. Também há evidências de polimorfismos em genes responsáveis pela biossíntese de antígenos lipopolissacarídeos (LPS), que conferem característica lisa ou rugosa e em genes que codificam antígenos protéicos periplasmáticos e citoplasmáticos. Outras fontes de variabilidade dentro do genoma de *Brucella spp.* também são estudadas e devem conter informações taxonomicamente relevantes. Além do mais, genes envolvidos com características da membrana externa, principalmente os envolvidos na síntese de LPS podem ajudar a entender as diferenças nas interações do organismo com o hospedeiro animal (CLOECKAERT, VISCAÍNO, 2004). Estas novas informações apóiam a manutenção da classificação atual do gênero e a divisão em espécies (FOSTER *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2002; CLOECKAERT, VISCAÍNO, 2004).

### 2.3 Patogenia

A *Brucella spp.* desenvolveu uma patogênese fundamental para seu parasitismo intracelular: as rotas de exposição natural variam entre a orofaringe para *B. abortus* e *B. mellitensis* ao trato genital no caso de *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, sendo que a morfogênese das lesões piogranulomatosas estimuladas por *Brucella spp.* refletem a natureza de um parasitismo persistente (ADAMS, 2002). A infecção é transmitida por meio de contato com membranas fetais, descargas vaginais pós-parto, leite (GODFROID, 2002) e de forma venérea

principalmente em cães (HOLLET, 2006). Invadem o hospedeiro por via oral, através da mucosa conjuntiva, feridas cutâneas e até mesmo através da pele intacta (FRANCO et al., 2007) (Figura 1). O período de incubação é de 2 a 10 dias, podendo perdurar por até seis meses (TZANEVA et. al., 2009). Uma característica importante das cepas virulentas deste gênero é atuar de forma altamente infecciosa quando em suspensão em aerossóis (rota presumida para usos militares) (HOOVER, FRIEDLANDER, 1997).



**Figura 1.** Transmissão de *Brucella* spp. entre diferentes hospedeiros. ADAPTADO (ALTON, FORSYTH, 1996).

A única característica patogênica destas bactérias, que são desprovidas de fatores de virulência clássicos como toxinas, cápsulas, flagelo, plasmídeo e variação antigênica entre outros, é a afinidade por células do sistema reticulo-endotelial. Invadem células monocíticas fagocitárias, são levadas a linfonodos regionais e podem colonizar tecido respiratório, neurônios e tecidos reprodutivos (CUTLER et al., 2005). Multiplicam-se utilizando diversas organelas celulares sem romper ou interferir em seu ciclo de vida celular, ao contrário, tendem a inibir a apoptose das células infectadas, alimentando um ciclo vicioso essencial para sua sobrevivência (PAPPAS, PAPADIMITRIOUS, 2007).

A patogenicidade de *Brucella* spp. está diretamente relacionada com sua habilidade

em sobreviver e se adaptar ao ambiente de replicação, ou seja, células epiteliais, trofoblastos placentais, células dendríticas e macrófagos (GORVEL, 2008), isto inclui níveis baixos de nutrientes e oxigênio, pH ácido e presença de radicais livres. A resistência descrita deve-se também ao LPS, não só importante estruturalmente, mas também para a integridade celular, suas propriedades são vitais para os mecanismos de sobrevivência e replicação intracelular (FRANCO et al., 2007).

Alguns estudos mostram que durante a infecção de macrófagos, *Brucella* spp. internaliza a célula após deslizar sobre a superfície celular por vários minutos, um processo denominado “*swimming internalization*”. Neste processo, uma proteína secretada pelo Sistema de secreção Tipo IV (SST4), a chaperona Hsp60, interage com o príon celular (PrP<sup>c</sup>), formando uma cauda com o PrP<sup>c</sup> e promovendo a transdução de um sinal que regula o estabelecimento da infecção que ocorre por meio de *rafts* lipídicos e formação de autofagossomos (WATARAI et. al., 2003). O Sistema de secreção do tipo IV (SST4), um complexo da parede bacteriana formado por 12 proteínas VIRB, é essencial para a formação destes compartimentos que são denominados “Vacúolo contendo *Brucella*” (BCV). Aparentemente, em grande parte das células infectadas, o SST4 regula o tráfego intracelular e desta forma o BCV interage com endossomos e se funde com a membrana do retículo endoplasmático (RE) para estabelecer o compartimento de replicação celular evitando fusão com lisossomos (GORVEL, 2008).

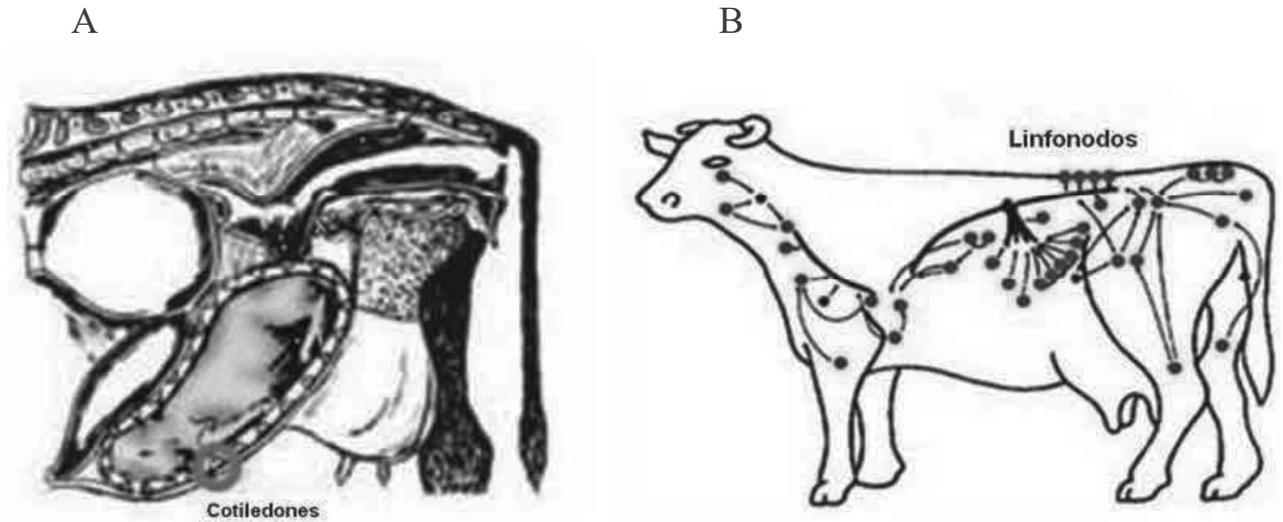
O LPS também é outra molécula antigênica essencial no estabelecimento da brucelose, capaz de confundir o sistema imune do hospedeiro. No caso de *B. abortus*, o LPS é incapaz de induzir a explosão respiratória, a liberação de mediadores inflamatórios, citocinas e compostos nitrogenados bactericidas (FRANCO et al., 2007). O LPS de *B. mellitensis* não estimula fator de necrose tumoral ou óxido nítrico. Em *B. suis* o LPS atua facilitando a invasão de macrófagos por receptores desconhecidos, e evita fusão com lisossomos. No geral é altamente resistente a degradação por macrófagos e bloqueia o desenvolvimento da resposta imune específica e inata, todas as cepas lisas tendem a inibir a apoptose celular e escapar da vigilância do Sistema imunológico do hospedeiro (GORVEL, 2008; SELEEN et al., 2008).

Outro fator de virulência característicos do gênero essencial para a persistência de *Brucella* spp. é o sistema de dois componentes BvrS-BvrR, responsável pela homeostase funcional e estrutural da membrana citoplasmática e também pode ser responsável pela invasão de células hospedeiras (LOPEZ-GONI, MANTEROLA, PAN, 2004; GORVEL E

MORENO, 2002).

PEI et. al. (2008) demonstraram que apesar de evitar apoptose celular, *Brucella* spp. é exclusivamente danosa para macrófagos, causando necrose dependente do SST4. Observou-se que o SST4 é criticamente importante para a citotoxicidade em macrófagos, pois secreta fatores de virulência da bactéria, ou seja, proteínas efetoras, dentro das células hospedeiras, levando a necrose por lise mediada por formação de poros na membrana celular.

Entre as atividades patogênicas relacionadas ao gênero podemos citar a capacidade de inibição das células Dendríticas (CD) que são importantes na ativação de resposta imune específica (GORVEL, 2008). Devido a sua habilidade em escapar do sistema imune, a fase de bacteremia em infecções de *Brucella* spp. parece acontecer de forma transitória, anterior a invasão de fagócitos podendo reaparecer em casos crônicos. Normalmente, em uma primeira etapa, a bacteremia pode ser indetectável e a quantidade de bactérias circulantes no hospedeiro pode ser inferior a cem unidades. Por outro lado, as síndromes de brucelose aguda sempre são acompanhadas de cultura de sangue positivo. O reconhecimento, quando possível, da bacteremia significa um risco maior de reincidência e também pode ser sinônimo de disseminação secundária e desenvolvimento de complicações focais (PAPPAS, PAPADIMITRIOUS, 2007). Por ser disseminada pelo sistema retículo endotelial, presume-se que *Brucella* spp. possa causar doença em qualquer sistema orgânico do hospedeiro. Os alvos principais da bactéria são as grandes articulações e o esqueleto axial (HOOVER, FRIEDLANDER, 1997). Em ruminantes o útero gravídico, placenta e anexos são preferencialmente colonizados por *Brucella* spp. (Figura 2), sugere-se que isto ocorra pela presença do açúcar eritritol produzido (ESSEMBERG et. al., 2002). O crescimento incontrolável do organismo dentro de células trofoblásticas leva a necrose da placenta, abortamento ou nascimento de animais fracos, caracterizando uma infecção aguda (FICHT, 2003). A brucelose apesar de raramente ser fatal é extremamente debilitante, na maioria das vezes é uma doença de caráter crônico e persistente, mesmo quando tratada tende a reaparecer (FRANCO et. al., 2007).



**Figura 2.** Localização preferencial de *Brucella* spp. (A) Placenta, cotilédones do útero gravídico bovino ([HTTP://www.limousin.com.br/pages/artigos/vendo.asp?ID=63](http://www.limousin.com.br/pages/artigos/vendo.asp?ID=63)). (B) Disseminação pelo sistema retículo endotelial, linfonodos regionais ([HTTP://www.mcguido.vet.br/linfonodos\\_vaca](http://www.mcguido.vet.br/linfonodos_vaca)).

Os sintomas em humanos incluem febre ondulante, anorexia, cefaléia, dores articulares, nervosismo e depressão. Encefalite, meningite, endocardite, espondilite, artrite, orquite e abortamento ocorrem ocasionalmente, os casos mais graves geralmente estão relacionados à *B. mellitensis*. Em Bovinos e caprinos, a principal característica da doença é no âmbito reprodutivo, ocorrendo abortamentos e mortalidades neonatais, retenção de placenta e metrite, além da diminuição em torno de 25% na produção leiteira. Ovinos podem apresentar epididimite em infecção por *B. ovis*, mas também é suscetível a brucelose clássica por *B. mellitensis* (SELEEN et al., 2009).

*Brucella canis* pode causar infertilidade, morte embrionária e reabsorção fetal, relatadas em cadelas além de dor e atrofia testicular; diminuição de libido, volume e qualidade do ejaculado em cães machos. Ambos os sexos podem desenvolver discoespondilite, meningoencefalite ou uveíte em resposta contra *B. canis* (HOLLET, 2006). Algumas pesquisas em humanos indicam a possibilidade de predisposição genética à infecção por *Brucella* spp., segundo um estudo publicado recentemente, indivíduos com polimorfismos

no gene TGF  $\beta$ 1 podem apresentar maior suscetibilidade a brucelose e ao aparecimento de formas focais. O Fator de crescimento e transformação (TGF  $\beta$ 1- “Transforming growth factor”) é uma citocina antiinflamatória secretada por células T ativadas por antígenos e fagócitos mononucleares ativados por LPS, e promove a resposta humoral (BRAVO et. al., 2008).

## 2.4 Epidemiologia

A distribuição geográfica da brucelose está sempre sendo alterada, com novos focos emergentes ou re-emergentes. Novos focos de brucelose humana emergiram em diversas regiões do planeta, incluindo principalmente a região do Mediterrâneo (SELEEN et. al., 2009; XAVIER et. al., 2009) e do Oriente Médio (XAVIER et., al., 2009; EREN et. al., 2006), onde *B. mellitensis* se encontra disseminada, causando grave doença em humanos ligados à criação de pequenos ruminantes (XAVIER et al., 2009).

Em todo o mundo, a prevalência da brucelose bovina, causada pela *B. abortus*, em varia entre 0.85% a 23.3%, com exceção de Austrália, Canadá, Chipre, Dinamarca, Holanda, Nova Zelândia, Suécia e Reino Unido, que sustentam uma classificação de livre da doença, após erradicação da brucelose bovina. No entanto, apesar de alguns países nunca terem detectado *B. mellitensis* em seu território, não há relatos confiáveis de sua erradicação em qualquer país, permanecendo um problema em alguns países citados acima e em países em desenvolvimento (SELEEN et.al., 2009; GODFROID et. al., 2005). A brucelose suína (*B. suis* biovars 1, 2 e 3) é considerada emergente, é uma doença de suínos e suínos selvagens, mas também afeta o gado, cavalo, coelhos, cães, humanos (XAVIER et. al., 2009) e também atinge camelos em todos os países que praticam sua criação (ABBAS, 2002). A brucelose ocorre na Europa e nas Américas, Sudeste Asiático e ilhas do Pacífico (XAVIER et. al., 2009).

A *Brucella canis* originalmente associada com cães, é predominantemente transmitida por via venérea, secretada em grande numero em secreções reprodutivas. Cães podem ser assintomáticos e a bactéria também pode estar presente na urina do animal pelo menos por três meses após infecção. Relatos documentam epidemias de brucelose canina ao redor do mundo, desde os Estados Unidos, também México, Europa, Brasil, Canadá e Japão (HOLLET, 2006).

Na América do Sul, alguns países que enfrentam problemas em relação à brucelose bovina, atualmente são obrigados a planejar e desenvolver meios de controlar e erradicar a doença de seu território (POESTER et. al., 2002; SAMARTINO, 2002; RIVERA et. al., 2002). No Chile, a brucelose bovina apresentava altas taxas de prevalência e incidência, atingindo 38% dos rebanhos em algumas regiões de produção leiteira. Após cinco anos do início do Programa de erradicação, diversas regiões chilenas obtiveram status de livres de brucelose (RIVERA et. al., 2002). Na Argentina, apesar de contarem com um programa visando controle e erradicação desde 1982, apresentaram seu terceiro Programa Nacional de erradicação em 1999, a prevalência encontrada dentro dos rebanhos está entre 4% e 5%, e 10-15% dos rebanhos apresenta algum caso da doença. A brucelose caprina por *B. mellitensis* biovar 1 também foi descrita na Argentina chegando a uma prevalência de 25% em algumas localidades. Também ocorre a brucelose suína causada pela *B. suis* biovar 1, mas constantemente ocorrem infecções por *B. suis* consideradas atípicas, pois as cepas não correspondem à classificação atual e induzem o abortamento em larga escala além de causarem lesões severas em tecidos linfáticos como baço e linfonodos (SAMARTINO, 2002). Na Venezuela, são descritas na maioria dos casos infecções por *B. abortus*, não raramente são descritos casos de *B. suis* causando surtos de abortamentos em granjas suínas e *B. mellitensis* foi observada, mas existem poucos estudos sobre seus impactos na saúde pública e em populações animais (VARGAS, 2002). Dados obtidos na Venezuela indicaram infecção por *Brucella* spp. em capivaras (*Hidrochaeris hidrochaeris*), 58% dos animais testados foram positivos, as cepas isoladas destes animais foram identificadas como *B. abortus* e *B. suis* (LORD, FLORES, 1983).

No Brasil, embora a brucelose esteja disseminada por todo território nacional, poucas investigações para identificação dos diferentes biovars de espécies de *Brucella* foram conduzidas. No geral, já foram isolados *B. abortus* biovars 1, 2 e 3; *B. suis* biovar 1; *B. ovis*; e *B. canis*. A *B. mellitensis* nunca foi isolada e é considerada de pouca importância no país (POESTER et. al., 2002).

O primeiro caso notificado no Brasil ocorreu somente em 1893, diagnosticada em paciente humano. Enumeras publicações entre 1930 e 1950 descreveram a doença em diversos estados brasileiros e a maioria dos casos humanos ocorreu de forma ocupacional, principalmente em trabalhadores de abatedouros e locais de processamento de carne. No Rio Grande do Sul ficou conhecido que as taxas de prevalência em bovinos eram maiores em

áreas rurais, maiores em machos do que em fêmeas e principalmente em pessoas com idade entre 20 e 49 anos. No país, o consumo de queijo é bastante difundido tanto em áreas urbanas e rurais, de forma muito comum os queijos são frescos e preparados com leite não pasteurizado, que é a fonte mais provável de infecção em humanos. Devido a relatos e serviços de diagnóstico inadequados, brucelose no Brasil tende a ser subestimada (POESTER et. al., 2002).

O país apresenta situação endêmica para brucelose, com maior prevalência em regiões de maior densidade animal. Alguns estados alcançaram sucesso na aplicação de um programa de vacinação e diminuíram índices de soropositividade, conforme registrado no Rio Grande do Sul, cuja prevalência da doença caiu de 2.0% em 1977 para 0.2% em 1998. O Mato Grosso do Sul, manteve os índices estáveis até 1998, com taxa de 6.3% de prevalência. Os dados oficiais indicam que a prevalência da brucelose no Brasil entre 1989 e 1998 alternou entre 4 e 5%. (POESTER et. al., 2002).

No estado de Goiás, um levantamento sorológico de 2001, entre eqüinos portadores de bursite fistulada cervical ou nugal, revelou prevalência de 73% de anticorpos contra *Brucella* spp.. Em 53,7% das propriedades amostradas neste estudo que mantinham criações simultâneas com bovinos, observou-se soro positividade nas duas espécies (SILVA et. al., 2001). Em abatedouros de eqüinos na região sul e sudeste do Brasil, testes sorológicos revelaram 2% prevalência entre animais abatidos (ALMEIDA et. al., 2007). Equinos que compartilham pastagens com gado infectado por *Brucella* spp. demonstraram ter uma chance maior de adquirir uma infecção. A co-habitação de ambas as espécies consiste em um fator de risco para brucelose bovina e eqüina (COHEN et. al., 1992).

SANTOS et. al. (2007) relataram recentemente 5,97% de animais soropositivos para brucelose, abatidos em um matadouro municipal no município de São Luis do Maranhão. Dentre os animais positivos, 28% apresentavam bursite e a presença de *Brucella* spp. foi confirmada por culturas positivas. Neste mesmo estudo verificou se que 10% dos funcionários do matadouro reagiram positivamente ao diagnóstico de brucelose. BASTIANETTO et al. (2005) pesquisaram brucelose entre búfalos encontrando 35% de animais soropositivos em uma região do estado de Minas Gerais, além de citar prevalências de 20,6% no estado de Goiás, 4,33% a 5,69% e 10% em regiões diferentes do estado de São Paulo, indicando que a brucelose também consiste em um problema reprodutivo dentro desta espécie no Brasil.

MONTEIRO et. al. (2006) conduziram um estudo epidemiológico em uma região

estratificada do estado do Mato Grosso do Sul, representado 19,7% da área do estado e contendo um rebanho de 5.7 milhões de rezes. Obteve-se taxa de prevalência real entre os animais de 5,6%. Entre rebanhos a prevalência real foi de 37,3%, além de ter sido identificado alguns fatores de risco para brucelose na região, como tipo de exploração (corte), a raça Zebuína, a ocorrência de abortamento, presença de áreas alagadiças e introdução de novos animais no rebanho. No pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, touros e matrizes testados apresentaram taxas de 6,9% e 2% de positivos, respectivamente (PELLEGRIN et. al., 1999). Em outra região do Pantanal, localizada no estado do Mato Grosso, presumidamente concluiu-se que a brucelose estava presente em 82% das criações de bovinos, com 10 % dos animais infectados (TOCANTINS et. al., 2000).

O Ministério da Agricultura do Brasil lançou em 2001 um Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). A estratégia consiste em: vacinação obrigatória de novilhas com idade de 3-8 meses com a cepa 19; certificação voluntária de propriedades livres de acordo com padrões internacionais; monitoramento voluntário de rebanhos de corte baseado em esquema de amostragem periódica; testes regulatórios em animais de reprodução e de exposição, em relação aos movimentos interestaduais e ingressos em feiras e exposições; abate obrigatório de animais considerados positivos nos testes sorológicos em abatedouros credenciados; padronização de procedimentos diagnósticos por meio de cursos de curta duração para veterinários credenciados (POESTER et. al., 2002).

Um dos aspectos ainda pouco conhecidos na epidemiologia da brucelose é a ocorrência de hospedeiros mamíferos suscetíveis portadores do agente, que podem dispersar e manter a *Brucella* spp. dentro das populações. Diversos estudos têm tentado estabelecer a importância de tais espécies em áreas endêmicas ou em áreas de re-emergência da doença (PAPPAS, PAPADIMITRIOUS, 2007; MATHIAS, GIRIO, DUARTE, 1999). Embora no Brasil poucos estudos tenham sido conduzidos em relação à fauna silvestre afetada pela brucelose, MAYOR et. al., (2006) relataram entre outras doenças diagnosticadas, a presença de 4,9% de animais positivos para *Brucella* spp. entre suínos selvagens na região próxima a Belém do Pará, na floresta Amazônica. Região em que normalmente e predominantemente tem a pecuária como principal atividade econômica.

Trabalhos de investigação sorológica e bacteriológica têm demonstrado que *Brucella* spp., especialmente *B. abortus* e *B. suis* podem infectar diversas espécies de animais

selvagens (LORD, LORD, 1991) principalmente os ungulados silvestres que, não só apresentam respostas sistêmicas em comum com ruminantes e outros ungulados domesticados, mas também podem trabalhar como mantenedores do agente no ambiente, sendo considerados reservatórios naturais e de grande importância na epidemiologia da doença (PAULIN, 2003)

Na Europa um problema sério é o atual aumento de surtos de brucelose em granjas suínas relacionadas à transmissão de *B. suis* provenientes de animais como lebres e porcos selvagens (GARCIA-YOLDI, et al., 2007). *Brucella suis* tem sido isolada em roedores, *B. melitensis* em impala (*Aepyceros melampus*) e *B. abortus* em waterbucks. Na África as taxas de infecção por *Brucella* spp. em búfalos africanos (*Syncerus caffer*) e gnus (*Conchates taurinus*) é de 30% e 18% respectivamente, atingindo animais de todas as idades e sexo (WAGHELA E KARSTAD, 1986).

Nos Estados Unidos, o veado vermelho (*Cervus elaphus*) e o bisão (*Bison bison*) tem sido infectados por *B. abortus* a mais de meio século na grande região de Yellowstone. No estado da Califórnia populações de porcos selvagens (*Sus scrofa*) apresentaram soro prevalência de 23.4% para *Brucella* sp. (VAN DER LEEK et al., 1993). No Canadá, há relatos de caprinos selvagens da espécie Bighorn (*Ovis canadensis*) que contraíram brucelose a partir de um feto abortado de veado vermelho (KREEGER et al., 2004). *Brucella* spp. Na Argentina, UHART et al. (2003) detectaram anticorpos para *Brucella* spp. em 4% dos cervídeos da espécie *Ozotoceros bezoarticus celer*. *B. abortus* e *B. suis* foram isoladas em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e *Brucella* spp. em de amostras de lebres (*Lepus europeus*) e raposas cinzas (*Dusicyon sp.*) (LORD, FLORES, 1983).

## **2.5 Diagnóstico**

### **2.5.1 Diagnostico indireto**

O diagnóstico sorológico tem capacidade de detectar anticorpos principalmente no soro e no leite de animais infectados, permitindo o monitoramento de propriedades e regiões e é a base no combate à brucelose em diversos programas estabelecidos em diferentes países. Os testes devem ser realizados respeitando a padronização de antígenos e especificações de cada prova de acordo com as normas técnicas de organismos internacionais (PAULIN, 2003).

No Brasil, de acordo com o PNCEBT de 2001, os testes preconizados para o diagnóstico da brucelose são o teste do Antígeno acidificado tamponado (TAAT), também conhecido como teste do Rosa Bengala, para triagem inicial. Os animais positivos no teste de triagem confirmatoriamente são testados em uma prova mais específica, o teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) e/ou a Reação de Fixação do Complemento (RFC) (PAULIN, 2003; POESTER et. al., 2003) Os principais testes indiretos utilizados para o diagnóstico da brucelose são:

#### **2.5.1.1 Teste do Antígeno acidificado tamponado**

O Teste do Antígeno acidificado tamponado (AAT) é uma prova qualitativa rápida e prática com boa sensibilidade que foi desenvolvida com base na observação de que IgG bovina é mais ativa em pH ácido com maior poder de aglutinação em pH  $3,65 \pm 0,05$ , também ocorre a redução da reatividade de IgM's, mas não deixa de detectá-las. Demonstrou-se que o TAAT foi capaz de identificar 95% de animais positivos em culturas bacterianas e é a melhor alternativa para o diagnóstico coletivo de bovinos. Quando comparado a outros testes foi capaz de detectar o maior número de reatores positivos (PAULIN, 2003).

#### **2.5.1.3 Teste do 2-Mercaptoetanol**

O teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) é um reagente utilizado para o tratamento de amostras de soro, com finalidade de inibir a atividade aglutinante das plurivalentes IgM's. Ocorre a degradação da IgM em cinco unidades monoméricas semelhantes não aglutinantes que não se comportam como Ac univalentes incapazes de gerar complexos grande suficientes para provocar a aglutinação. Portanto o tratamento com o 2-ME impede a maioria das reações inespecíficas e promove maior reatividade da IgG<sub>1</sub> e diminui reatividade da IgG<sub>2</sub>. O teste detecta ambas IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>, mas a sensibilidade aumenta devido ao aumento na reatividade das IgG<sub>1</sub> que facilita sua detecção. A concordância relatada entre 2-ME e RFC é de 97% (PAULIN, 2003).

#### **2.5.1.4 Reação de Fixação do Complemento**

A reação de fixação do complemento (RFC) é considerada a prova de melhor acurácia

para o diagnóstico sorológico de brucelose. É uma prova mais laboriosa e cara quando comparada com os testes de aglutinação, sendo preferencialmente utilizada para confirmação dos testes de triagem. A técnica praticada a quente diminui as reações anti-complementares e elimina IgM, aumentando a especificidade do teste. A RFC a quente tem sido utilizada em programas de controle como forma de confirmação de animais positivos em diversos países. Detecta de forma precoce, em torno do 14<sup>o</sup> dia, as IgG<sub>1</sub> no soro animal, por possuir um baixo limiar de detecção também é capaz de detectar casos crônicos, quando as IgM's já desapareceram e os níveis de IgG's são baixos. O código Zoosanitário Internacional da OIE refere ao teste de RFC como importante suporte técnico e exigência do mercado externo recomendando-o como prova confirmatória para o teste de triagem AAT (PAULIN, 2003).

#### **2.5.1.5 Teste de ensaio imunoenzimático**

Dentre todos os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), o que apresenta melhores resultados para o diagnóstico da brucelose são os chamados ELISA's indiretos competitivos. Utilizados comumente na Europa e América do Norte, possuem boa sensibilidade e especificidade com a vantagem de não ocorrer o fenômeno de zona da RFC. A utilização do teste ELISA como prova sorológica em alguns países vem aumentando devido as suas vantagens em relação à combinação do AAT e do RFC. Como limitação, a utilização do ELISA depende de laboratório bem equipado, pessoal treinado e exige maior tempo de execução. Também podemos citar alto investimento inicial e a impossibilidade de distinguir animais vacinados dos infectados. As vantagens incluem alta sensibilidade e alta especificidade além de haver possibilidade de automatização e assim aumentar o número de soros testados simultaneamente. A variação do teste denominado CELISA da mesma forma apresenta sensibilidade e especificidade altas e tem o benefício de poder diferenciar animais vacinados dos realmente infectados e possibilita a utilização de um mesmo conjugado para testar soros obtidos de diferentes espécies animais (PAULIN, 2003)

#### **2.5.1.6 Prova do anel do leite (PAL)**

A prova do anel do leite (PAL) é geralmente realizada a partir de amostras compostas de leite de vários animais, em plataformas de usinas de beneficiamento do leite. Tem a

finalidade de triagem de rebanhos infectados e deve ser realizada de três a quatro vezes ao ano. O teste revela anticorpos (Ac), em maior parte os da classe IgA presentes no leite, aderidos em moléculas de gordura pela extremidade da cadeia pesada do anticorpo denominada fração Fc (*Cristal fraction*) ou fração efetora. Quando o Ac. interage com o antígeno corado (hematoxilina ou tetrazólio), forma-se uma malha de aglutinação que flutua junto com a gordura e surge um anel colorido. A prova é rápida, prática, barata e de alta sensibilidade, é de grande utilidade nas investigações sorológicas como teste presuntivo para identificar rebanhos potencialmente infectados. Na vigilância epidemiológica pode ser utilizado no controle sistemático de áreas livres.

## **2.5.2 Diagnóstico Direto**

### **2.5.2.1 Cultura bacteriana**

Baseada no isolamento de culturas bacterianas consideradas suspeitas a partir de tecidos, leite e exsudatos vaginais do hospedeiro, seguido de caracterização bacteriológica. É considerada “padrão ouro” no diagnóstico da brucelose, é confiável e geralmente definitivo. Os organismos *Brucella* podem ser caracterizados quanto a gênero, espécies, subespécies (biovars) e algumas vezes cepas, no caso de cepas vacinais (BRICKER, 2002).

O isolamento de culturas bacterianas tem suas limitações. Primeiro, o longo tempo que leva o processo, desde a obtenção das amostras clínicas até a identificação, normalmente em torno de duas semanas. Durante este período, o produtor, a indústria ou o paciente doente podem ser submetidos a procedimentos desnecessários caso a suspeita não seja confirmada. Segundo, o teste é complexo e deve ser realizado em laboratório especializado por pessoal altamente treinado. Algumas características são subjetivas, como morfologia de colônia, e necessitam de olhos treinados e a experiência de um especialista. E em terceiro, a natureza zoonótica da maioria das espécies de *Brucella* é um risco potencial para os trabalhadores que devem manipular o agente infeccioso durante os testes. Por último, os resultados nem sempre são definitivos, isto devido ao grande número de colônias visualizadas e o pequeno número de diferenças entre algumas espécies e biovars, uma pequena mutação pode gerar dados conflitantes e complicar a interpretação do teste (BRICKER, 2002).

### 2.5.2.2 Reação da Polimerase em cadeia

Diversos trabalhos têm sido publicados desde o ano de 1987 baseados na utilização da reação da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico direto da brucelose (BRICKER, 2002). A PCR permite detectar um fragmento específico do DNA bacteriano presente nas amostras analisadas (PAULIN, 2003). Os primeiros testes visaram detectar um locus genético simples e único, que fosse altamente conservado para *Brucella* spp. mas não permite a diferenciação entre espécies, somente identificação do gênero. Este tipo de teste tem um desenho simples e é bastante robusto, no geral a PCR é bastante sensível e específica. Os testes baseados na PCR são úteis na triagem ou para identificação do agente quando espécies e biovars não são necessidades críticas. Outros ensaios utilizando PCR buscam um loci genético variável entre as espécies e biovars de *Brucella*. Enquanto algumas grandes deleções ou re-arranjos genéticos vêm sendo relatado dentro das espécies e biovars, a maioria das diferenças genéticas consiste em polimorfismo de um único nucleotídeo. Os diagnósticos diferenciais baseados na PCR podem ajudar no rastreamento epidemiológico do agente ou em programas de erradicação espécie-específicos, inclusive é capaz de distinguir cepas vacinais de cepas selvagens (BRICKER, HALLING, 1995; BRICKER, 2002).

A fase inicial do processo da PCR consiste na obtenção do DNA purificado diretamente a partir dos espécimes clínicas sem necessidade de isolar em culturas a bactéria. A preparação da amostra é essencial para o sucesso da reação, já que a maioria das fontes estudadas é rica em fatores inibidores da PCR. A concentração inicial da amostra também é bem importante para se obter um limite aceitável de detecção, uma vez que só podemos utilizar volumes mínimos da amostra na reação (1-10 $\mu$ l). Como ferramenta de diagnóstico veterinário, a PCR tem sido aplicada a tecidos do hospedeiro, incluindo fetos e anexos placentais, sangue, leite, secreções nasais (BRICKER, 2002) e sêmen (VINODH et al., 2008). Cada tipo de amostra apresenta dificuldades inerentes e únicas no preparo adequado das reações. Em uma primeira fase, objetiva-se a lise das células e liberação do DNA bacteriano (assim como do hospedeiro), depois o isolamento do DNA por fenol seguido de concentração do DNA por precipitação em álcool, por ultimo a ressuspensão ou diluição do DNA em volumes mínimos. As dificuldades mais comuns vão da co-purificação de inibidores da PCR com o DNA e por interferência do DNA excessivo do hospedeiro. Superados estes problemas, a PCR funciona muito bem e podem exceder a sensibilidade alcançada pela cultura direta

(BRICKER, 2002).

Outro método de diagnóstico baseado na PCR foi desenvolvido para identificar e diferenciar as espécies de *Brucella*. O teste é conhecido como PCR AMOS (sigla para identificar abortus, melitensis, ovis e suis) e utiliza um primeiro *primer* correspondente ao elemento IS711 e um *primer* específico para cada espécie de *Brucella*, que se liga a uma sequência única dentro do genoma da bactéria, gerando amplicons de diferentes tamanhos. Os *primers* são escolhidos de forma que a diferença entre as espécies seja determinada pelo tamanho do amplicon (BRICKER, HALLING, 1995; BRICKER, 2002; HINIC et al., 2008). Atualmente o teste PCR AMOS apresenta inclusive a possibilidade de ser realizado pela técnica de PCR em tempo real utilizando os mesmos *primers* da reação convencional (HINIC et al., 2008).

## 2.6 Pantanal

O Pantanal é uma enorme bacia sedimentária, de baixo declive, considerada uma das maiores áreas alagáveis do mundo, com uma variação plurianual da intensidade da inundação, alternando anos de elevada inundação com anos mais secos (MAURO, 2002; HARRIS et al., 2005). As enchentes variam sazonalmente em duração, altura e extensão, provocadas pela alta precipitação local ou extravasamento dos rios. Está localizada em sua maior parte entre dois estados brasileiros, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. É dominada por rios que drenam a bacia do Alto Paraguai (MAURO, 2002) e vegetação heterogênea influenciada por quatro biomas: Floresta Amazônica, Cerrado (predominante), Chaco e Floresta Atlântica (HARRIS et al., 2005). Apresenta numerosas lagoas de água doce ou salobra, vazantes e corixos, que compõem o ambiente aquático. O clima é quente e chuvoso no verão e ameno e seco no inverno, com maior concentração de chuvas de dezembro a março. Os solos em sua maioria são hidromórficos com textura arenosa e de baixa fertilidade (MAURO, 2002).

Cerca de 120 espécies de mamíferos ocorrem no Pantanal, algumas consideradas ameaçadas (MAURO, 2002) como o veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) são abundantes na região e ocorrem em maior densidade do que em outras regiões de cerrado. O Pantanal tem a característica de apresentar extrema

abundância de algumas espécies, mas com baixo grau de espécies endêmicas ou especialistas. Assim, o Pantanal serve como criadouro para espécies de distribuição ampla, em geral, as espécies que ocorrem no Pantanal são características dos biomas adjacentes: Cerrado, Chaco e Amazônia sendo o Cerrado o bioma que mais compartilha espécies de fauna com o Pantanal, tanto em relação à planície, quanto em relação às áreas do entorno. tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*), lobinho (*Cerdocyon thous*), quati (*Nasua nasua*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), onça pintada (*Panthera onca*), veado campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), sauiá (*Trichomys apereoides*), capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e a queixada (*Tayassu pecari*) representam alguns dos grupos de mamíferos que habitam a região (RODRIGUES et al., 2002) que também é considerada a área úmida mais rica em aves do mundo além de ser uma importante rota migratória (MAURO et al., 2005). Quarenta e um anfíbios e 177 répteis (MÉDRI, MOURÃO, 2004), e mais de 260 espécies de peixes foram registrados no Pantanal (BRITSKI et al., 1999).

O Pantanal é reconhecido como Patrimônio Nacional e designado pela Unesco como Reserva da Biosfera, de grande significância global. Atualmente, a substituição de modelos tradicionais de pesca e pecuária por exploração intensiva, acompanhada do desmatamento e degradação de cursos de água vêm ameaçando o frágil equilíbrio dos ecossistemas do Pantanal (MAURO et al., 2005). O estado do Mato Grosso do Sul detém o maior rebanho bovino do Brasil. No Pantanal o gado é encontrado em praticamente todas as regiões e a pecuária é uma importante atividade local. Os rebanhos comerciais são constituídos de grupos de animais indianos (*Bos indicus*) que atualmente são mais frequentes, e grupos europeus (*Bos taurus taurus*) que foram trazidos para a região há aproximadamente 250 anos e deram origem a uma raça pantaneira que hoje em dia está ameaçada de desaparecer da região. Dados referentes ao ano de 1995 indicam que a abundância de bovinos na região está na ordem de 3.9000000 para todo Pantanal. Outra espécie de mamífero introduzida mais recentemente pelo homem é o búfalo (*Bubalus bubalis*), com mais de 100 anos na região, a população mínima estimada destes animais é de 5.100. A caça no Pantanal já foi de grande preocupação no passado quando espécies como o jacaré-do-pantanal (*Caiman crocodilus yacare*) e a ariranha eram extensivamente caçadas para retirada do couro e pele bastante valorizados. Apesar da pressão da caça não ser a maior preocupação do Pantanal, a onça pintada (*Panthera onca*) e a onça parda (*Puma concolor*) são perseguidas pelos produtores rurais por predarem o gado. Porcos selvagens foram introduzidos há mais de um século, atualmente estão distribuídos por

todo Pantanal de forma abundante, têm sido caçados como alternativa ao consumo de carne. O uso mais intensivo dos habitats do Pantanal tem sido limitado por fatores culturais (o modo tradicional da criação de gado), assim como pela falta de tecnologia e pelo baixo investimento de capital. Entretanto, essa situação está mudando rapidamente, com a pecuária tornando-se cada vez mais competitiva e intensificada e com a rápida expansão da agricultura irrigada dentro da planície. (HARRIS et al, 2005).

### 2.6.1 Mamíferos Silvestres

No Brasil a fauna silvestre já foi considerada como daninha à criação de animais domésticos devido a sua importância na epidemiologia de doenças e já foi tratada como competidora com as atividades econômicas no campo. É algumas vezes fonte de admiração e explorada pelo turismo não predatório além de ser vista como uma fonte alternativa de rendimento para o empresário rural.

A fauna existente na região não é endêmica, e está representada por espécies oriundas de biomas vizinhos. O Chaco e a Floresta Meridional Atlântica contribuem com espécies animais para o Pantanal, assim como o Cerrado e a Floresta Amazônica. Além dos mamíferos terrestres, outras espécies de mamíferos, especificamente morcegos, ocorrem em todas as sub-regiões do Pantanal. Na região é possível encontrar populações de onça pintada (*Panthera onca*) mesmo após diminuição drástica de seus habitats. A onça pintada é o principal predador do pantanal, mamífero de grande porte, sua dieta inclui mamíferos de médio porte como, capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), queixadas (*Tayassu pecari*), caititus (*Tayassu tajacu*), antas (*Tapirus terrestris*), cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e presas domésticas como o cão e o gado bovino (SCHALLER, VASCONCELOS, 1978). A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) também é encontrada na região, é um mamífero de médio porte conhecido por serem caçadores terrestres eficientes além de apresentarem a habilidade de subir em árvores podendo se alimentar de uma grande variedade de presas em sua maioria pequenos vertebrados de até um kg (CONCONE et al., 2005).

O Lobinho (*Cerdocyon thous*) é outra espécie comumente avistada no Pantanal Sul Mato-Grossense, pode chegar a pesar seis kg e apresenta hábitos noturnos. Sua alimentação inclui pequenos mamíferos e répteis em época de seca e consomem frutos e insetos em época de inundações (SANTOS JUNIOR, MACEDO, 2007).

O Quati (*Nasua nasua*) é outro animal amplamente distribuído pelo Pantanal, as fêmeas andam em grandes grupos com os filhotes e os machos geralmente são solitários, são animais onívoros e a extensão de seus habitats variam de acordo com a disponibilidade de alimentos (JUAREZ, MARINHO FILHO, 2002). O tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*) também tem hábitos alimentares semelhantes, incluindo carniça e pequenos vertebrados como anuros e pequenos roedores (FONSECA et al., 1996). Como o Sauia da espécie *Trichomys pachyurus* que habitam grande parte da região oeste do Brasil, no Pantanal é encontrado em grandes áreas abertas com gramíneas e pasto inclusive áreas de floresta invadidas pelo pasto (ROQUE et al., 2005).

O veado campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) é uma das espécies que mais necessita de estudos e proteção, sua vulnerabilidade se deve ao seu habitat que são os campos utilizados massivamente pela pecuária e agricultura. Essa espécie se tornou rara, sendo avistadas somente em áreas de proteção como o Parque Nacional de Emas e no Pantanal, que é uma das únicas regiões onde as populações ainda são vigorosas (MAURO et al., 2002).

### **2.6.2 Brucelose no Pantanal**

No Pantanal do Mato Grosso do Sul se concentra o maior rebanho bovino do estado. Dentre os diversos problemas sanitários que afetam o rebanho pantaneiro, a brucelose vem sendo diagnosticada em diversas propriedades através de alguns estudos epidemiológicos (PELLEGRIN et al., 2006) Em outra região do Pantanal, localizada no estado do Mato Grosso, TOCANTINS et al. (2000) indicaram que a brucelose estava presente em 82% das criações de bovinos, com 10 % de prevalência individual, de animais infectados. Apesar da brucelose ser considerada uma importante zoonose, a falta de relatos da doença na população humana na região não permite que conheçamos o seu impacto na saúde pública local, apenas podemos estimar o impacto econômico na produção animal. Alguns estudos demonstram que animais criados em algumas propriedades pantaneiras com grandes áreas alagadiças, que adquirem bovinos de outras regiões, mantêm raças de bovinos de corte (Zebuína) e apresentem histórico de abortamentos freqüentes estão sob um risco maior de adquirir a doença (MONTEIRO et al., 2006). Em outras regiões do globo, onde a brucelose se mantém endêmica, as propriedades rurais que permitem interação entre o gado e mamíferos selvagens

apresentam uma maior chance dos animais contraírem brucelose (MUMMA et. al., 2007). Algumas espécies de animais que ocorrem no Pantanal, como a capivara e os porcos asselvajados (*Sus scrofa feral*) tem sido diagnosticados com brucelose em diversas localidades (LORD, FLORES, 1983; LORD, LORD, 1991; GODFROID 2002). Possivelmente por se tratar de uma área endêmica da doença, há grande chance de que estes animais, e outros mamíferos silvestres tenham importância significativa na epidemiologia da brucelose no Pantanal. Dependendo da taxa de transmissão entre espécies, uma doença pode persistir em inúmeros animais portadores ou hospedeiros alternativos, que em grupos funcionam como uma comunidade de hospedeiros para o patógeno. Se as espécies diferentes infectadas não interagem, direta ou indiretamente, a existência desse hospedeiro alternativo é irrelevante para o estabelecimento do patógeno entre os hospedeiros disponíveis. Quando há interação, o estabelecimento do parasita será favorecido devido à presença do hospedeiro alternativo. Assim, erradicação ou controle da doença em um sistema de múltiplos hospedeiros se torna muito mais difícil e deve envolver manejo da doença em ambas as populações de animais selvagens e rebanhos comerciais (BÖHM et. al., 2007).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, B.; AGAB, H. A review of camel brucellosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.55, p.47–56, 2002.

ADAMS, L.G. The Pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. **Veterinary Microbiology**, v.20, p.553-61, 2002.

ALMEIDA, C.A.S.; RIBEIRO, M.G.; MEGID, J.; VASCONCELLOS, A.S.; BORGES, A.S.; BONESI, G. Ocorrência de aglutininas anti-*Brucella abortus* em soros de equídeos de abatedouro. In: Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária, **Resumos**, v.2, Fortaleza: CNSPV, (CD-ROM), 2007.

ALTON, G.G.; FORSYTH, J.R.L. *Brucella* General Concepts Clinical Manifestations. In: Baron, S. **Medical Microbiology**, 4 ed., University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, 1996. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A1537>> Acessado em 15 de maio de 2010.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY *Brucella* species In: **Sentinel Laboratory Guidelines For Suspected Agents Of Bioterrorism**. p. 1-17, 2004.

BASTIANETTO, E.; AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; OLIVEIRA, D.A.A.; LEITE, R.C. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco - Minas Gerais. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.29, p.55-56, 2005.

BÖHM, M.; WHITE, P.C.L.; CHAMBERS, J.; SMITH, L.; HUTCHINGS, M.R. Wild deer as a source of infection for livestock and humans in the UK. **The Veterinary Journal**, v.174,

p. 260–276, 2007.

BRAVO, M.J.; COLMENERO, J.D.; QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; ALONSO, A.; CABALLERO, A. TGF- $\beta$ 1 and IL-6 gene polymorphism in Spanish brucellosis patients. **Cytokine**, v. 44, p.18–21, 2008.

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

BRICKER, B.J.; HALLING S. M. Enhancement of the Brucella AMOS PCR Assay for differentiation of Brucella abortus Vaccine Strains S19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.1640-1642, 1995.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millenia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **Journal Infectology**, v.45, p.122-127, 2002.

COHEN, N.D.; CARTER, G.K.; MULLAN, W.C.. Fistulous withers in horses. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.201, p.121-124, 1992.

CONCONE, H.V.; MAURO, R.A.; AGUIAR, L.M.S. Jaguaririca (*Leopardus pardalis*). In: **Fauna e Flora do cerrado**, 2005. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/series/ema/Ema.htm>> Acesso em 10 de dezembro de 2009.

CUTLER, S.J.; WHATMORE, A.M.; COMMANDER, N.J. Brucellosis – New aspects of a old disease. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p. 1270-1281, 2005.

DAGLEISH, M.P.; BARLEYJ.; FINLAYSON, J.; REID, R.J.; FOSTER, G. Brucella ceti Associated Pathology in the Testicle of a Harbour Porpoise (*Phocoena phocoena*) .

**Comparative Pathology**, v. 139, p.54-59, 2008.

DAHOUK, S.A.; NÖCKLER, K.; TOMASO, H.; SPLETTSTOESSER, W.D.; JUNGERSEN, G.; RIBER, U.; PETRY, T.; HOFFMAN, D.; SCHOLZ, H.C.; HENSEL, A.; NEUBAUER, H. Seroprevalence of Brucellosis, Tularemia, and Yersiniosis in Wild Boars (*Sus scrofa*) from North-Eastern Germany. **Journal Veterinary Medicine**, v.52, p.444–455, 2005.

ESSEMBERG, R.C.; SESHADRI, R.; NELSON, K.; PAULSEN, I. Sugar Metabolism by *Brucellae*. **Veterinary Microbiology**, v.90 p.249-261, 2002.

EREN, S.; BAYAM, G.; ERGÖNÜL, O.; CELIKBAS, A.; BAYKAM, N.; DOKUZOGUZ, B.; DILBAZ, N. Cognitive and emotional changes in neurobrucellosis. **Infectology**, v.53, p.184-9, 2006.

FICHT, T.A. Intracellular survival of *Brucella*: Defining link with persistence. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.213-223, 2003.

FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; COSTA, C.M.R. Lista anotada de mamíferos do Brasil. **Ocasional papers in Conservation Biology**, v.4, p.1-38, 1996.

FOSTER, G.; McMILLAN, A.P.; GODFROID, J.; HOWIE, F.; ROSS, H.M.; CLOECKAERT, A.; REID, R.J.; BREW, S.; PATTERSON, I.A.P. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.563–580, 2002.

FRANCISCO, J.; VARGAS, O. Brucellosis in Venezuela. **Veterinary Microbiology**, v.20, p.39-44, 2002.

FRANCO, M.P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H.; SMITS, H.L. Human Brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, p.775-786, 2007.

GARCÍA-YOLDI, D.; LE FLECHE, P.; DE MIGUEL, M.J.; MUÑOZ, P. M.; BLASCO, J.M.; CVETNIC, Z.; MARI'N, C.M.; VERGNAUD, G.; LÓPEZ-GOÑI, I. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Other PCR-Based Methods for Typing *Brucella suis* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p. 4070–4072, 2007.

GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. **Revue scientifique et technique: Office international des Épizooties**, v.21, p.277-286, 2002.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.; KHOLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J.J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, v.36, p.313–326, 2005.

GORVEL, J.P. *Brucella*: a Mr “Hide” converted into Dr Jekyll. **Microbes and Infection**, v.10, p.1010-1013, 2008.

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

GUL, S.T.; KHAN, A. EPIDEMIOLOGY AND EPIZOOTOLOGY OF BRUCELLOSIS: A REVIEW. **Pakistan Veterinay Journal**, v.27, p.145-151, 2007.

HARRIS, M.B.; TOMAS, W.M.; MOURÃO, G.; SILVA, C.J.; GUIMARÃES, E.; SONODA, F.; FACHIN, E. Desafios para proteger o Pantanal brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. **Revista Megadiversidade**, v.1, p.156-164, 2005.

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

HOLLET, B.R. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v.66, p. 575–587, 2006.

HOOVER, D.L.; FRIEDLANDER, A.M. Brucellosis In: **Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare**, p. 513-521, 1997. Disponível em: <[http://www.bordeninstitute.army.mil/published\\_volumes/chembio/Ch25.pdf](http://www.bordeninstitute.army.mil/published_volumes/chembio/Ch25.pdf)> Acessado em 21 janeiro de 2010.

JUAREZ, K.M.; MARINHO-FILHO, J. Diet, habitat use and home ranges of sympatric canids in central Brazil. **Journal Mammalian**, v.83, p.925-933, 2002.

KREEGER, T.J.; COOK, W.E.; EDWARDS, W.H.; CORNISH, T. Brucellosis in Captive Rocky Mountain Bighorn Sheep (*Ovis canadensis*) Caused by *Brucella abortus* Biovar 4. **Journal of Wildlife Diseases**,v.40, p. 311–315, 2004.

LORD, V.R.; FLORES, R. *Brucella* spp. From the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Venezuela: Serologic Studies and Metabolic Characterization of Isolates. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 19, n.4, p.308-314. 1983.

LORD, V.R.; LORD, R.D. *Brucella suis* infection in Collared Peccaries in Venezuela. **Journal of Wildlife Disease**, v.27, n.3, p.477-481, 1991.

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

MAURO, R. Estudos Faunísticos na Embrapa Pantanal. **Archives Zootechny**, v.51, p.175-185, 2002.

MÉDRI, I.M.; MOURÃO, G. A fauna do Pantanal. **Ação Ambiental**, p.14-17, 2004.

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

MIRANDA, J.M.D.; BERNARDI, I.P.; ABREU, K.C.; PASSOS, F.C. Predation on *Alouatta clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae) by *Leopardus pardalis* (Linnaeus) (Carnivora, Felidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, p.793-795, 2005.

MONTEIRO, L. A. R.C.; PELLEGRIN, A.O.; ISHIKAWA, M. M.; OSORIO, A. L. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.26, p.217-222, 2006.

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

NIELSEN K. , DUNCAN J.R. **Animal Brucellosis**. CRC Press, Boca Raton, 1990, 464p.

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

OHISHI, K.; TAKISHITA, K.; KAWATO, M.; ZENITANI, R.; BANDO, T.; FUJISE, Y.; GOTO, Y.; YAMAMOTO, S.; MARUYAMA, T. Molecular evidence of new variant *Brucella* in North Pacific common minke whales. **Microbes and Infection**, v.6 , p.1199–1204, 2004.

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

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

PEDÓ, E.; TOMAZZONI, A.C.; HAERTZ, S.M.; CHRISTOFF, A.U. Diet of crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnivora, Canidae), in a suburban area of southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.23 p.637-641, 2006.

PELLEGRIN, A.O; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C.;FIGUEIREDO, H.C.P. Doenças da reprodução em Bovinos no Pantanal: Ocorrência de animais soropositivos para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Diarréia Bovina a vírus e Língua Azul. **Comunicado Técnico**. Embrapa Pantanal, 20, 1997, 7p.

PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. M. H. ; SERENO, J.R.B.; LAGE, A.P. LEITE, R.C.; RAVAGLIA, E. Brucelose bovina no Pantanal Sul-Matogrossense: dados preliminares. **Comunicado Técnico**,58, Embrapa Pantanal, Corumbá. 2006, 4p.

PEI RAGAN, V.E. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.11–18, 2002.

RHYAN, L.C.; GIDLEWSKI, T.; ROFFE, T.J.; AUNE, K.; PHILO, L.M.; EWALT, D.R. PATHOLOGY of Brucellosis in Bison from Yellowstone National Park. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, p.101-109, 2001.

RIBEIRO, M.G.; MOTTA, R.G.; SCACHETTI, C.A.A. Brucelose eqüina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, p.83-92, 2008.

Rivera S.A, Ramírez M.C, Lopetegui, I.P. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. **Veterinary Microbioly**,v. 20; p.45-53, 2002.

ROCHA, V.J.; REIS, N.R.; SEKIAMA, L.M. Dieta e dispersão de sementes por *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae), em um fragmento florestal no Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**,v.21, p.871–876, 2004.

RODRIGUES, F.H.G.; MEDRI, I.M.; TOMAS, W.M.; MOURÃO, G.M. Revisão do conhecimento sobre ocorrência e distribuição de Mamíferos do Pantanal. **Documentos**, 38. Embrapa , Corumbá,2002, 38p.

ROQUE, A.L.R.; D'ANDREA, P.S.; ANDRADE, G.B.; JANSEM, A.M. Trypanosoma cruzi:distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Trichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimydae) **Experimental Parasitology**, v.111, p.37-46, 2005.

SAMARTINO, L.E.; Brucellosis in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v.20:90 (1-4); 71-80, 2002.

SANTOS-JUNIOR, T.S.; MACEDO, M. Potencial frugívoro e dispersor de sementes por

cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) em uma área de cerrado manejada para cultivo de Teca (*Tectona grandis*), Rosario Oeste- MT. In: Congresso de Ecologia do Brasil, 8. **Anais**. Caxambu, 2007.

SANTOS, H.P.; TEIXEIRA, W.C.; OLIVEIRA, M.M.M.; PEREIRA, H.M.; NEGREIROS, R.C.; SOARES-FILHO, P.M.; SANTANA, S.S.; CASTRO, R.S. Brucelose bovina e humana diagnosticada em matadouro municipal de São Luís - MA, BRASIL. **Ciência Veterinária Tropical**, v. 10, p. 86 - 94, 2007.

SELEEN, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucella: A pathogen without classic virulence genes. **Veterinary Microbiology**, v.129, p.1-14, 2009.

SCHALLER, G.B.; VASCONCELOS, J.M.C. Jaguar predation on capybara. **Zeitschrift fur Säugetierkunde**, v.43, p.296-301, 1978.

SILVA, L.A.F.; ACYPRESTE, C.S.; EURIDES, D.; MACHADO, G.V.; DIAS FILHOS, F.C.; FIORAVANTI, M.C.S.; RAMOS, L.S. Soroprevalência de brucelose em eqüinos portadores de bursite cervical ou nugal. **Arquivos Ciencia Veterinaria e Zoologia**. v.4, p.19-23, 2001.

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

TRYLAND, M.; SORENSEN, K.K.; GODFROID, J. Prevalence of *Brucella pinnipediae* in healthy hooded seals (*Cystophora cristata*) from the North Atlantic Ocean and ringed seals

(*Phoca hispida*) from Svalbard. **Veterinary Microbiology**,v.105, p. 103–111, 2005.

TZANEVA,V.; IVANOVA, S.; GIORGIEVA, M.; TASHEVA, E. Investigation of the spread of brucellosis among human and animal population on Southeasterns Bulgaria. **Eurosurveillance**, v. 14, 2009. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19187>> Acesso em 10 de março de 2010.

WATTAM, A.R.; WILLIAMS, K.P.; SNYDER, E.E.; ALMEIDA, N.F.; SHUKLA, M.; DICKERMAN, A.W.; CRASTA, O.R.; KENYON, R.; LU, J.; SHALLOM, J.M.; YOO, H.; FICHT, T.A.; TSOLIS, R.M.; MUNK, C.; TAPIA, R.; HAN, C.S.; DETTER, J.C.; BRUCE, D.; BRETTIN, T.S.; SOBRAL, B.W.; BOYLE, S.M.; SETUBAL, J.C. Analysis of Ten Genomes Reveals Evidence for Horizontal Gene Transfer Despite a Preferred Intracellular Lifestyle. **Journal of Bacteriology**, v.191, p.3569-3579, 2009.

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

WHO.[Report of the] Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance **WHO Technical Report Series**, n. 156, 46p, 2003.

WYATT, H.V. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. **Journal of the Royal society of medicine**, v.98, p.451-454, 2005.

VARGAS, F.J.O. Brucellosis in Venezuela.**Veterinary Microbiology**,v.20; n.90(1-4), p.39-44, 2002.

UHART, M.M.; VILA, A.R.; BEADE, M.S.; BALCARCE, A.; KARESH, W.B. Health Evaluation of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyu' Wildlife Reserve, Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**,v.39, p. 887–893, 2003.

VINODH, R.; DHINAKAR RAJ, G.; GOVINDARAJAN, R.; THIAGARAJAN, V. Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine sêmen using polymerase chain reaction. **Tropical Animal Health Production**, v. 40, p. 323-329, 2008.

XAVIER, M.N. COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. **Ciência Rural**,v.39, n.7, p.2252-2260 2009.

ARTIGO CIENTÍFICO

## Identificação de mamíferos silvestres do Pantanal Sul-mato-grossense portadores de *Brucella* spp

Eduardo M. Corrêa<sup>1</sup>, Anahí Souto Vieira<sup>2</sup>, Gracia Maria Soares Rosinha<sup>3</sup>; Carina Elisei de Oliveira<sup>3</sup>, Rita de Cássia Bianchi<sup>4</sup>, Vitor Rademaker Martins<sup>4</sup>, Natalie Olifiers<sup>5</sup>, Walfredo M. Tomás<sup>6</sup>, Carlos André Zucco<sup>4</sup>, Cleber Oliveira Soares<sup>3</sup>, Flávio Ribeiro Araújo<sup>3</sup>, Guilherme Miranda Mourão<sup>6</sup>, Ubiratan Piovezan<sup>6</sup>, Aiesca Oliveira Pellegrin<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFMS. Cidade Universitária, 79070900 Campo Grande, MS, Brasil <sup>2</sup>Médica Veterinária, MSc, <sup>3</sup>Pesquisador, Dr., Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil, <sup>4</sup>Biólogo, Dr., <sup>5</sup>Doutoranda, Programa de Pós Graduação Fisheries & Wildlife Sciences, Universidade de Missouri, Missouri, USA, <sup>6</sup>Pesquisador, Dr. Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

### Resumo

A brucelose é uma antropozoonose de distribuição mundial, causada por bactérias coccobacillus gram-negativos, do gênero *Brucella* que infectam diversas espécies animais, domésticos e silvestres, bem como o homem. Neste trabalho foram analisadas amostras de sangue de sete espécies de mamíferos silvestres, coletadas em propriedades localizadas na sub-região da Nhecolândia, no Pantanal brasileiro, por meio do ensaio da polimerase em cadeia. Foram obtidos resultados positivos para a pesquisa do gene *virB5* de *Brucella* sp. em 7,1% (1/14) das amostras de *Thrichomys pachyurus* (saiuá), em 34% (11/32) *Nasua nasua* (quati), 24% (15/61) dos *Ozotocerus bezoarticus* (veado campeiro), 12% (3/25) dos *Cerdocyon thous* (lobinho) e em 67% (2/3) de *Leopardus pardalis* (jaguatirica). Estes resultados indicam que as espécies estudadas podem ser infectadas por espécies de *Brucella* sp. e o impacto da brucelose nos animais silvestres, assim como a importância destes animais na cadeia epidemiológica da brucelose necessitam ser melhor avaliada no Pantanal Sul-Mato-grossense.

*Palavras-chave:* Brucelose, animais silvestres, Pantanal, PCR.

## Identification of wild mammals of Pantanal Mato-grossense carriers of *Brucella* spp.

Eduardo M. Corrêa<sup>1</sup>, Anahí Souto Vieira<sup>2</sup>, Gracia Maria Soares Rosinha<sup>3</sup>; Carina Elisei de Oliveira<sup>3</sup>, Rita de Cássia Bianchi<sup>4</sup>, Vitor Rademaker Martins<sup>4</sup>, Natalie Olifiers<sup>5</sup>, Walfrido M. Tomas<sup>6</sup>, Carlos André Zucco<sup>4</sup>, Fabiana Lopes Rocha<sup>6</sup>, Cleber Oliveira Soares<sup>3</sup>, Flávio Ribeiro Araújo<sup>3</sup>, Guilherme Miranda Mourão<sup>7</sup>, Ubiratan Piovezan<sup>7</sup>, Aiesca Oliveira Pellegrin<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFMS. Cidade Universitária, 79070900 Campo Grande, MS, Brasil <sup>2</sup>Médica Veterinária, MSc, <sup>3</sup>Pesquisador, Dr., Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil, <sup>4</sup>Biólogo, Dr., <sup>5</sup>Doutoranda, Programa de Pós Graduação Fisheries & Wildlife Sciences, Universidade de Missouri, Missouri, USA, <sup>6</sup>Doutoranda, Biologia Parasitária, Fundação Oswaldo Cruz, <sup>7</sup>Pesquisador, Dr. Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

### Abstract

Brucellosis is an anthroponosis with worldwide distribution, caused by gram-negative bacteria coccobacillus, the genus *Brucella* infects different animal species, wild and domestic, as well as humans. This study analyzed blood samples of seven species of wild mammals, collected from properties located in the sub-region Nhecolândia in the Brazilian Pantanal, using the polymerase chain reaction assay. Positive results were obtained for the research of gene *virB5* *Brucella* spp. 7.1% (1 / 14) samples of *Thrichomys pachyurus* (saiuá) in 34% (11/32) *Nasua nasua* (quati), 24% (15/61) of *Ozotocerus bezoarticus* (pampas deer), 12% (3 / 25) of *Cerdocyon thous* (cub) and 67% (2/3) of *Leopardus pardalis* (Ocelot). These results indicate that these species can be infected by *Brucella* sp. and the importance of these animals in the epidemiological chain of brucellosis should be evaluated in the Brazilian Pantanal, Mato Grosso.

*Key words: Brucellosis, wildlife, Pantanal, PCR,*

## INTRODUÇÃO

Brucelose é uma antropozoonose de distribuição mundial, causada por bactérias coccobacillus gram-negativos, do gênero *Brucella* que infectam diversas espécies animais inclusive humanos (WHATARAI, 2006; NICOLETTI, 2002). A brucelose está entre as doenças de bovinos que requerem maior atenção e controle global (CHEVILLE, McCULLOUGH, PAULSON, 1998), sendo a *B. abortus* um dos patógenos de maior impacto econômico e na saúde pública (PEI et al., 2008). Os prejuízos econômicos provocados pela brucelose são decorrentes de abortamentos, baixos índices reprodutivos, perda de prestígio das propriedades infectadas, menor valor dos animais e produtos provenientes de áreas acometidas e restrições para mercados potenciais (WHO, 2003).

No Brasil a brucelose esta disseminada por todo o território. Dados oficiais sobre notificação da brucelose bovina no Brasil, coletados no período entre 1988 e 1998 demonstram que a media de soro positividade entre os animais notificados varia entre 4% e 5%. No estado de Mato Grosso do Sul a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3% (BRASIL, 2001) e no Pantanal, um estudo epidemiológico indicou soro prevalência de 3,4% (MONTEIRO et al. 2006).

No Brasil, estudos epidemiológicos em animais silvestres são raros, no entanto pesquisas em outros países demonstraram que estes são suscetíveis a brucelose, podendo apresentar níveis moderados de infecção (MATHIAS, GIRIO, DUARTE, 1999). Na Europa houve um aumento de surtos de brucelose em granjas suínas relacionadas à transmissão interespecífica de *B. suis* de animais como lebres e porcos selvagens (GARCIA-YOLDI, et al., 2007). *B. suis* tem sido isolada em roedores, *B. melitensis* em impala (*Aepyceros melampus*) e *B. abortus* em antilopes *waterbucks*. Na África as taxas de infecção por *Brucella* spp. em búfalos africanos (*Syncerus caffer*) e gnus (*Connochates taurinus*) é de 30% e 18% respectivamente, atingindo animais de todas as idades e sexo (WAGHELA, KARSTAD, 1986). A *B. abortus* pode infectar diversas espécies de animais selvagens (LORD, LORD, 1991), principalmente os ungulados que, após a infecção, atuam como reservatórios naturais, mantendo o agente no ambiente, sendo, desta forma, considerados de grande importância na epidemiologia da doença (PAULIN, 2003).

Nos Estados Unidos, o veado vermelho (*Cervus elaphus*) e o bisão (*Bison bison*) têm

sido infectados por *B. abortus* ha mais de meio século, na grande região de Yellowstone. No estado da Califórnia populações de porcos selvagens (*Sus scrofa*) apresentaram soro prevalência de 23,4% para *Brucella* spp. (VAN DER LEEK et al., 1993). No Canadá, há relatos de caprinos selvagens da espécie *Bighorn* (*Ovis canadensis*) que contraíram brucelose a partir de um feto abortado de veado vermelho (KREEGER et al., 2004). *Brucella* spp. foi isolada a partir de amostras de lebres (*Lepus europeus*) e raposas cinzas (*Dusicyon* spp.). Na Argentina, UHART et al. (2003) detectaram anticorpos para *Brucella* spp. em 4% dos cervídeos da espécie *Ozotoceros bezoarticus celer*. Em outras regiões da América latina *B. abortus* e *B. suis* foram isoladas em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (LORD, FLORES, 1983) e *Brucella* spp. foi detectada em catetu (*Tayassu tajacu*) na Venezuela (LORD, LORD, 1991). O atual aumento na incidência da brucelose pode ser atribuído a modificações nos sistemas de criação, alterações ecológicas e de uso da terra além da ocorrência, cada vez mais comum, de interações entre rebanhos domésticos e vida selvagem (MENEGHI, 2006). Hoje em dia há a necessidade de demonstrar se a interação entre os animais silvestres e rebanhos domésticos tem implicações causais (MUMA et al., 2007). Assim, o objetivo deste estudo foi determinar freqüência e potenciais reservatórios de *Brucella* spp. entre espécies de animais selvagens do Pantanal sul-mato-grossense por um teste de reação em cadeia da polimerase (PCR).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras para identificação de reservatórios silvestres

Para o estudo de potenciais reservatórios de *Brucella* spp. foram utilizadas 14 amostras de sangue de *Thrichomys pachyurus* (roedor), 32 de *Nasua nasua* (quati), 61 de *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro), 25 de *Cerdocyon thous* (lobinho), 02 de *Panthera onca* (onça pintada) e 03 de *Leopardus pardalis* (jaguaritica), coletadas em propriedades localizadas em torno da fazenda Nhumirim (campo experimental da Embrapa Pantanal) localizada na região conhecida como Nhecolândia, no Pantanal brasileiro (18° 59' 15'' S; 56° 37' 03'').

As capturas dos carnívoros foram feitas utilizando-se armadilhas tipo Tomahawk (Tomahawk Live Trap Co., Tomahawk, WI), contendo iscas, colocadas no chão e em girais que variam de 0,8 a 1,5 m de altura, ao longo de trilhas e interior de cordilheiras e em locais freqüentemente utilizados, principalmente aqueles onde eram encontrados rastros e/ou já tenham sido obtidas visualizações dos

mesmos. As armadilhas permaneciam armadas o dia inteiro, sendo checadas no início da manhã e final da tarde. Após a captura, os espécimes eram anestesiados com tiletamina e zolazepan (Zoletil® - Virbac do Brasil, 10 mg/kg), quando então era coletado o sangue por venopunção. A captura dos veados campeiro foi realizada por meio de dardo anestésico, lançados a distância por pistolas de CO<sub>2</sub> com pressão regulável (Distinject®, modelo 35) ou uma zarabatana de 2 m X 11 mm de diâmetro (Zootech®). A contenção química empregada em 42 animais foi realizada com os anestésicos Tiletamina e Zolazepan ou Zolazepan e xilazina (PIOVEZAN et al. 2006). As capturas foram realizadas com licença ambiental do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) de nº (032/2005) 0214.0022008/05-00 e (005/2007) 02014.000382/2007-22,): (16010-1) 6425591/33454426, (003/2006) 0214.000540/2005-82, (006/20007) 02038.000114/06-90, (005/2007) 02014.000382/2007-22, (015/2007) 02014.000419/07-97, (003/2006) 0214.000540/2005-82.

#### **Extração do DNA genômico**

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de aproximadamente 350µl de papa de hemácias acrescido de 2 µL de proteinase K (20 mg/mL) mais 500 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% e homogeneizado em vórtex e incubado a 65 °C por 1 h. Foram adicionados 800 µL de clorofórmio e agitado vigorosamente em vórtex e, em seguida foi adicionado 350 µL da solução de precipitação protéica (3M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>, 2M CH<sub>3</sub>COOH) e homogeneizado novamente. A amostra foi centrifugada por 19000 xg durante 10 min. O sobrenadante foi coletado e tratado com 1 mL de etanol absoluto gelado e homogeneizado por inversão até formar um precipitado e após foi centrifugado a 19000 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70%. Logo após, a amostra foi centrifugada a 19000 xg por 3 min e o sobrenadante descartado. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µL de TE (10 mM tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8.0 ) acrescido de RNase e estocado a -20°C até o momento de uso. A qualidade e concentração dos DNAs extraídos foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop e por eletroforese em gel de agarose, corado com *Sybr Gold* e visualização em transiluminador ultravioleta.

#### **Escolha dos genes para *Brucella* spp e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A escolha do gene foi baseada em uma busca na literatura balizada em estudos de espécies de *Brucella* e também foi realizada uma busca em bases de dados do GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foi utilizado o *primer* do gene *virB5* (type IV secretion systems – fator de virulência) sendo *primer virB5 Forward* (5'-GAATTCTACGAAGCGGTGATGAGCG-3') e *virB5 Reverse* (5'-CTCGAGGTGTAGATGATGTGTTGCGTG-3') que permitiu a amplificação de um fragmento de aproximadamente 500 pares de base (pb), relativo ao gene.

As reações de PCR foram preparadas em termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler gradient) Os produtos então amplificados foram observados por eletroforese a 80 por 1 hora, separados por gel de agarose a 1%, corados com *Sybr Gold* e visualizados com transluminador sob luz ultravioleta.

### Sequenciamento

Os fragmentos de *virB5* isolados foram clonados em vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega®). A construção plasmidial foi inserida em células competentes Top 10 e D-H5 $\alpha$ , que cresceram em meio Difco™ Luria Broth Base, Miller sob agitação “*over night*”, o pré-inoculo foi plaqueado em meio Difco™ Luria Agar Base, Miller contendo 100mg/ml de ampicilina, X-gal (50mg/ml) e IPTG (1mM). As colônias brancas indicaram transformação positiva das células que passaram a conter o incerto desejado, portanto selecionadas para posterior mini preparação de plasmído (MiniPrep®).

Com as amostras de Miniprep, realizou-se a reação de sequenciamento com kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®), utilizando 1 $\mu$ l de *primer M3 forward* e 1 $\mu$ l *primer M3 reverse* a 5pmol, em reações separadas; 2 $\mu$ l de Big Dye; 2 $\mu$ l de tampão 5X e 5 $\mu$ l de PCR purificada. A placa com as reações foram colocadas no termociclador e posteriormente purificadas com EDTA e álcool e ressuspendidas com formamida. As amostras foram sequenciadas utilizando o método de Sanger (SANGER, 2004), em sequenciador capilar (Applied Biosystems® modelo 3130). O resultado dos sequenciamentos foram analisados com o programa *Blast n* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a qualidade das ondas no eletroferograma foram analisadas com o programa *Bio Edit*.

### Análise Filogenética

As amostras sequenciadas foram alinhadas com o auxílio do programa Mega 4.0 (TAMURA et al. 2007). Os tamanhos das sequências foram de aproximadamente 500 pb. Os fragmentos analisados neste trabalho não correspondem a sequência completa do gene *virB5*

de *Brucella* spp, que normalmente contem 717 pb em sua totalidade.

A árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbour-Joining (NJ), versão simplificada do método de mínima evolução (ME), que utiliza a distância medida para corrigir os vários acessos ao mesmo local (como o número de substituições de nucleotídeos ou aminoácidos), o qual escolhe uma topologia mostrando o menor valor da soma de todos os ramos como uma estimativa correta da árvore.

Para a construção da árvore filogenética foram utilizadas sequências (Tabela 1) que estão disponível no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Tab. 1 . Número de acesso no *GenBank* de *Brucella* spp.** correspondente, utilizada para a construção da árvore filogenética para análise parcial do gene *virB5*.

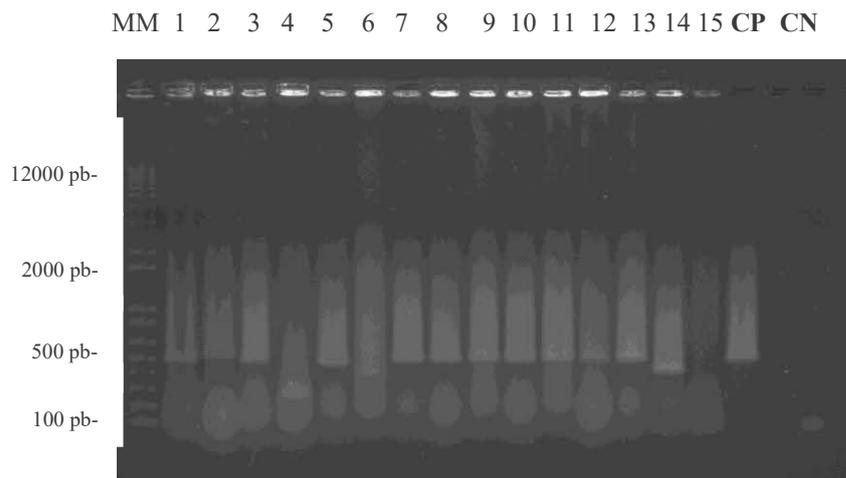
Nº acesso	<i>Brucella</i> spp.
CP000873.1	<i>Brucella canis</i> ATCC 23365 cromossomo II
CP000709.1	<i>Brucella ovis</i> ATCC 25840 cromossomo II
CP000912.1	<i>Brucella suis</i> ATCC 23445 cromossomo II
CP001489.1	<i>Brucella melitensis</i> ATCC 23457 cromossomo II
CP001579.1	<i>Brucella microti</i> CCM 4915 cromossomo II
AF226278.1	<i>Brucella abortus</i> genes <i>virB</i>
AE017224.1	<i>Brucella abortus</i> biovar 1 cepa 9-941 cromossomo II
CP001562.1	<i>Bartonella grahamii</i> as4aup
AF242881.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> octopine-type plasmídeo Ti

## RESULTADOS

Foram analisadas 135 amostras de sangue de sete espécies diferentes de mamíferos silvestres e 32(23,7%) das amostras testadas apresentaram um fragmento de 500 pb, sendo consideradas positivas na PCR (Tabela 2). O perfil eletroforético das amostras testadas na PCR, com amplificação de um fragmento de 500 pb referente a uma fração do gene *virB5* de *Brucella* spp é apresentado na Figura 1.

Tab. 2. Frequência de animais positivos na PCR entre as espécies estudadas, utilizando *primer* do gene *virb 5* de *Brucella* spp.

Espécie	Nº total de animais	Positivos na PCR	Frequência
<i>C.thous</i>	25	3	12%
<i>P.onca</i>	02	0	0
<i>L.pardalis</i>	03	02	67%
<i>N.nasua</i>	32	11	34%
<i>O.bezoarticus</i>	61	15	24%
<i>Thrichomys</i> spp.	14	01	7,10%
<b>TOTAL</b>	<b>135</b>	<b>32</b>	<b>23,7%</b>

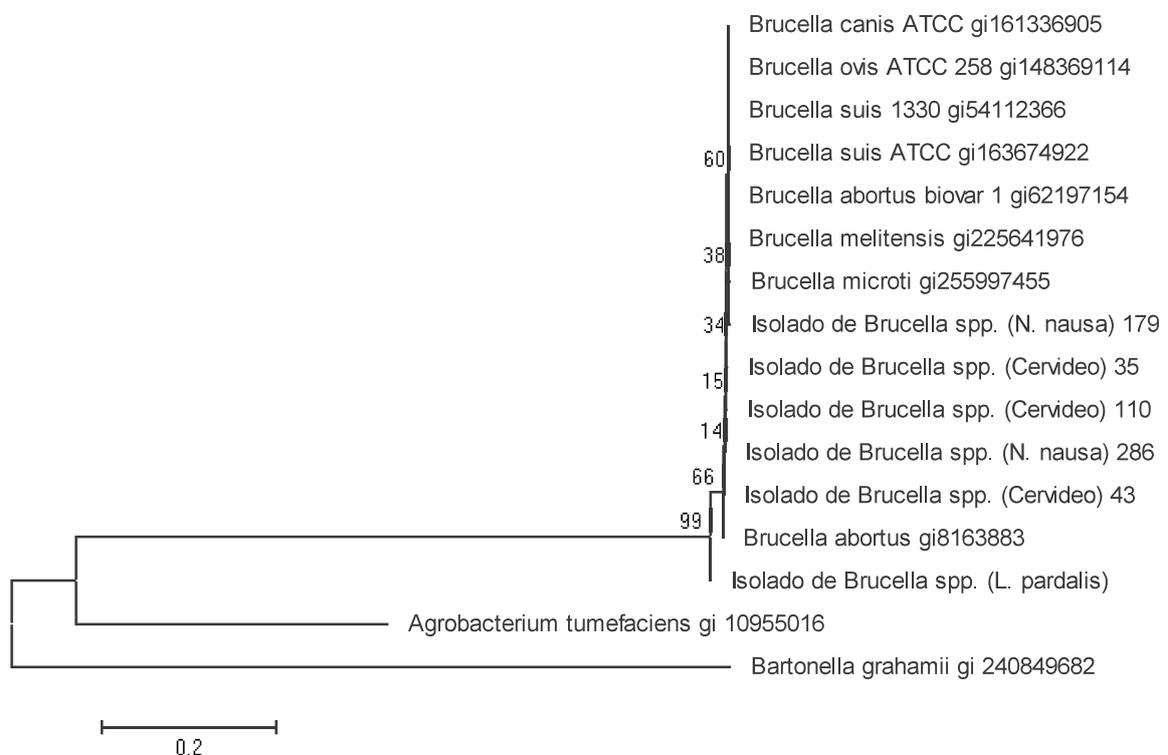


**Figura 1. Perfil eletroforético da PCR utilizando um primer Virb5 de *Brucella* spp.** Nas amostras 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 foi possível visualizar uma banda de 500 pb referente ao gene *virb 5* de *Brucella* spp. MM: massa molecular, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

As amostras positivas de *N. nasua*, identificadas como 179 e 286; de *O. bezoarticus* identificadas como 35, 43 e 110; e a amostra 72 de *L. pardallis* foram clonadas e sequenciadas. Após o sequenciamento, foi realizado o alinhamento com auxílio do programa Mega 4.0 (TAMURA et al. 2007) para se obter a sequência consenso a partir de três sequenciamentos de cada amostra e analisadas no eletroferograma (*Bio Edit*) que mostrou a ótima qualidade das sequências obtidas. A análise dos sequenciamentos das amostras positivas foram realizadas no Blast'N, onde foram alinhadas com genes do Sistema de Secreção tipo IV (*virB5*) de

bactérias do gênero *Brucella* com número de acesso no *GenBank* AF226278, os genes isolados de *O. bezoarticus* e *L. pardallis* apresentaram 100% de identidade ( $e = 0.0$ ) e os isolados de *N. nasua* apresentaram 99% de identidade com o gene *virB5* ( $e=0.0$ ).

Com os resultados obtidos foi construída a árvore filogenética (Figura 2), pelo alinhamento de sequências parciais do gene *virB5* depositadas no *GenBank*, pelo método de Neighbour-Joining. Após a separação de *Agrobacterium tumefaciens* e *Bartonella grahamii*, utilizadas como *out group*, obteve-se um grande grupo das *Brucella* spp.. Os genes *virB 5* isolados de *N. nasua*, *O.bezoarticus* e *L. pardalis* ficaram dentro deste grande grupo e não apresentam diferença quanto à topologia do grande grupo que inclui *B. canis* ATCC, *B. ovis* ATCC, *B. suis* 1330, *B. abortus*, *B. abortus biovar 1*, *B. melitensis* e *B. microti* pois estão dentro do mesmo clado, significando que entre estes genes e os genes *virb5* isolados neste estudo não há diferença topológica.



**Figura 2.** Filogenia de *Brucella* spp construída a partir do alinhamento de sequências parciais do gene *virB 5*. Método utilizado para a construção da árvore filogenética foi o de Neighbour-Joining programa (MEGA 3.1). O suporte para cada clado foi determinado por 1000 *bootsprap* indicando o valor dos nós internos (%).

## DISCUSSÃO

A identificação da presença de mamíferos silvestres infectados por *Brucella* spp. em uma região como o Pantanal Sul Mato-grossense é fundamental para a elaboração de um plano de controle e erradicação da doença nos bovinos e que minimize os riscos de transmissão interespecífica, ao mesmo tempo preservando a vida selvagem (RAGAN, 2002). O risco de transmissão existe quando diferentes espécies animais compartilham o mesmo ambiente, o que foi comprovado experimentalmente e também ficou evidente em observações realizadas por BÖHM et. al. (2007) que demonstraram que cervídeos selvagens foram fontes de infecção para humanos e rebanhos bovinos no Reino Unido (CHEVILLE, MCCULLOUGH, PAULSON, 1998).

Os resultados deste trabalho mostram que populações de mamíferos silvestres do Pantanal podem apresentar uma frequência elevada de indivíduos portadores de *Brucella* spp., a exemplo do veado-campeiro (24%), quatis (34%) e jaguatiricas (67%). A presença de animais portadores ou hospedeiros alternativos para *Brucella* spp. pode ser explicada pelo aumento na abundância de disponibilidade destes animais suscetíveis a uma doença particular como a brucelose o que favorece a transmissão e disseminação do agente a partir de um hospedeiro principal para um alternativo (BÖHM, 2007). Os felinos e canídeos silvestres são carnívoros e predadores e podem se alimentar de animais menores infectados ou até mesmo podem se alimentar de anexos fetais e produtos de abortamento de animais domésticos infectados, favorecendo a transmissão da doença.

No presente estudo, foram analisadas amostras de sangue de lobinho (*Cerdocyon thous*) que é o canídeo silvestre mais comumente encontrado no Pantanal (SILVA, 2004) e dentre os animais amostrados, 12% (3/25) foram considerados positivos. O lobinho apresenta uma dieta generalista e oportunista, e sua alimentação pode ser composta em até 87,62% por vertebrados (PEDÓ et. al., 2006). Em condições experimentais, coiotes (*Canis latrans*) infectados com *B. abortus* transmitiram de forma interespecífica o microrganismo para novilhas não vacinadas (DAVIS et al., 1988). TESSARO, FORBES (2004), demonstraram que lobos (*Canis lupus*) podem ser infectados por *Brucella abortus* biovar 1, isolada de bisões (*Bison bison*), passando a excretar a bactéria no ambiente, podendo ser fonte de infecção para outros animais. Em hipótese, se considerarmos a natureza de seu habito alimentar, os lobinhos podem ser infectados por bactérias como a *Brucella* spp. ao ingerirem pequenos

roedores ou até mesmo ao se alimentarem de restos de animais e produtos de abortamento de espécies que compartilham seu habitat, como os bovinos domésticos locais, que sabidamente apresentam altas taxas de abortamento, nascimento de crias fracas e bezerras com outras anomalias (PELLEGRIN et. al., 2006).

Das três amostras de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) analisadas, em duas foi possível detectar o gene *virb5* de *Brucella* spp. As jaguatiricas habitam e são comuns na planície pantaneira e em áreas de entorno da bacia (RODRIGUES et. al., 2002). A jaguatirica é um importante predador oportunista e suas escolhas são baseadas na abundância da presa, se alimentando inclusive de presas maiores como macacos e outros primatas (MIRANDA et. al., 2005). Poucos estudos foram realizados em relação à importância destes felinos na disseminação de zoonoses. A participação da jaguatirica como potencial reservatório e capacidade de disseminar o agente da doença necessita ser avaliada, da mesma forma que a patogenicidade da bactéria nestes felídeos.

O achado de um (7,10%) roedor da espécie *Thrichomys* spp. positivo na PCR para *Brucella* spp. pode indicar que estes animais são suscetíveis a infecção e podem representar risco para animais que se alimentam destes pequenos roedores, que atualmente tem sido estudado em relação a sua participação na transmissão de outras zoonoses, como a doença de chagas (TEIXEIRA et. al., 2005). O quati (*Nasua nasua*) e o tatu-peba são outros exemplos de pequenos mamíferos pantaneiros que também podem colaborar como hospedeiros naturais na manutenção da doença no ambiente. No Pantanal, os quatis são considerados reservatórios de outros agentes patogênicos como *Trypanosoma evansi* (SILVA, LIMA, 2004). No presente estudo, 34% das amostras de quatis foram positivas na PCR para o gene *VirB5* e pela sua ampla distribuição e hábito carnívoro é esperado que ele possa representar um papel importante no ciclo silvestre da doença.

Os resultados encontrados demonstraram 24% (15/61) de reações positivas entre veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) estudados. O veado campeiro é uma das espécies que ocorrem em maior abundância no Pantanal quando comparado a outros biomas. Tem maior densidade em campos e vazantes e são facilmente observados se alimentando ao lado de bovinos domésticos principalmente em fazendas da região central do Pantanal (RODRIGUES et. al., 2002).

Dentre os animais amostrados, as duas onças apresentaram resultados negativos, além de contarmos com um número baixo de amostras destes felídeos (n=2), as amostras foram

obtidas de uma região mais afastada da região da Nhecolândia onde os outros animais foram capturados.

A ocorrência de *O. bezoarticus* portadores de *Brucella* spp. neste estudo demonstra que co-habitação e o contato direto com bovinos domésticos infectados podem ser decisivos para a manutenção do agente dentro dos rebanhos suscetíveis, além do mais, os animais infectados, como ocorre na maioria das espécies ruminantes, podem servir como reservatório do agente e possivelmente as populações de ruminantes silvestres sofrem impactos decorrentes do estabelecimento da doença dentro das populações. É conhecido que a patogenia e as manifestações patológicas da brucelose na maioria das espécies de ruminantes silvestres ocorreram da mesma forma aguda que em ruminantes domésticos, causando abortamentos e seqüestro de bactérias em diversos tecidos do hospedeiro (RHYAN et al., 2009; RHYAN et al., 2001).

A interação entre diversas espécies no Pantanal pode ser compreendida através do estudo de MURI et al. (2007), que em uma fazenda da região Nhecolândia do Pantanal Sulmato- grossense, identificaram e registraram pegadas de nove espécies silvestres em solos ao redor de piletas de água utilizadas pelos bovinos, constatando indícios de uso da água pelos animais visitantes. As pegadas registradas indicavam presença de lobinhos, capivaras, veado campeiro e porco monteiro (*Sus scrofa*).

Em uma região como o Pantanal, onde há superposição de habitats entre populações de animais silvestres e bovinos, supostamente a presença de bovinos portadores de *Brucella* spp. (MONTEIRO et al., 2006; PELLEGRIN et al., 2006) é um fator que contribui para a manutenção da *Brucella* spp. nas espécies silvestres, apesar da técnica utilizada não permitir a identificação da espécie de *Brucella* sp. infectante. Dependendo da taxa de transmissão entre espécies, uma doença como a brucelose pode persistir em numerosas espécies hospedeiras alternativas, que em grupos funcionam como uma comunidade de hospedeiros para o patógeno. Se as diferentes espécies infectadas não interagem, direta ou indiretamente, a existência desse hospedeiro alternativo é irrelevante para o estabelecimento do patógeno entre os hospedeiros disponíveis. Quando há interação, o estabelecimento do agente patogênico poderá ser favorecido pela presença do hospedeiro alternativo. Assim, erradicação ou controle da doença em um sistema de múltiplos hospedeiros se torna muito mais difícil e deve envolver manejo da doença em ambas as populações, de animais selvagens e rebanhos comerciais (BÖHM et al., 2007) A contaminação de rios e vazantes do Pantanal por *Brucella*

spp. também pode vir a ser uma realidade, semelhante ao que foi constatado por TRAS et al. em um estudo de 2009, que identificou peixes da espécie *Clarias gariepinus* (Catfish) portadores de *B. mellitensis* que foram contaminados pelo gado bovino na região do Rio Nilo, no Egito. Esta condição seria um fator adicional favorável à disseminação geográfica do agente, atingindo um maior número de espécies suscetíveis.

Apesar de dados referentes à brucelose humana na região serem praticamente inexistentes, a importância da identificação das espécies animais que possam transmitir a doença tanto para o homem como para outros animais de interesse econômico são vitais. Estes animais infectados representam risco eminente à saúde pública, principalmente por que na região há a prática comum de caça de porcos ferais, que apesar de não terem sido avaliados no presente estudo, conhecidamente são suscetíveis e importantes transmissores de brucelose em diversos países onde a brucelose é endêmica (PAES et al., 2009).

## CONCLUSÃO

Dos animais amostrados neste estudo, a jaguatirica, o sauíá, o lobinho e o quati foram pela primeira vez diagnosticados para brucelose e a análise filogenética das amostras de sequências gênicas clonadas confirma que os isolados pertencem ao mesmo grupo genético em que se encontram todas as espécies do gênero *Brucella*. Como o gene estudado (*virB5*) é extremamente conservado dentro do genoma de *Brucella* spp., foi possível estabelecer o gênero de acordo com a identidade dos isolados mas não foi possível identificar a espécie de *Brucella* em questão, da mesma forma que no trabalho de ELISEI et al (2010) realizado em veados- campeiro. O impacto da brucelose nos animais silvestres, assim como a importância destes animais na cadeia epidemiológica da brucelose e a informação sobre quais as espécies de *Brucella* que circulam necessitam ainda ser melhor avaliadas no Pantanal Sul Mato-grossense.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÖHM, M.; WHITE, P.C.L.; CHAMBERS, J.; SMITH, L.; HUTCHINGS, M.R. Wild deer as a source of infection for livestock and humans in the UK. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 260–276, 2007.

BRASIL. Departamento de Defesa Animal. 2001. Informações sobre o PNCEBT. Brasília, Brasil: Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/das/dda/programa.htm>> Acesso em: 10 de janeiro de 2010..

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v.90, p. 435-446, 2002.

CHEVILLE, N. F.; MCCULLOUGH, D. R.; PAULSON, L.; R. **Brucellosis in the Greater Yellowstone Area**. National Research Council, 1998, 204p. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/5957.html>> Acesso em 24 de agosto de 2010.

DAVIS, D.S.; HECK, F.C.; WILLIAMS, J.D.; SIMPSON, T.R.; ADAMS, L.G. Interspecific transmission of *Brucella abortus* from experimentally infected coyotes (*Canis latrans*) to parturiente cattle. **Journal of Wildlife Diseases**, v.24, p.533-37, 1988.

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

FOSTER, G.; McMILLAN, A.P.; GODFROID, J.; HOWIE, F.; ROSS, H.M.; CLOECKAERT, A.; REID, R.J.; BREW, S.; PATTERSON, I.A.P. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.563–580, 2002.

GARCIA-YOLDI, D.; LE FLECHE, P.; DE MIGUEL, M.J.; MUÑOZ, P.M.; BLASCO, Z.C.;

MARÍN, C.M.; VERGNAUD, G.; LOPEZ-GOÑI, I. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p.4070-4072, 2007.

HARRIS, M.B.; TOMÁS, W.M.; MOURÃO, G.; SILVA, C.J.; GUIMARÃES, E.; SONODA, F.; FACHIN, E. Desafios para proteger o Pantanal brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. **Revista Megadiversidade**,v.1, p.156-164, 2005.

LORD, V.R.; FLORES, R. *Brucella* spp. From the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Venezuela: Serologic Studies and Metabolic Characterization of Isolates. **Journal of Wildlife Diseases**,v 19, p.308-314. 1983.

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

KREEGER, T.J.; COOK, W.E.; EDWARDS, W.H.; CORNISH, T. Brucellosis in captive rocky mountain bighorn sheep (*Ovis Canadensis*) caused by *Brucella abortus* biovar 4. **Journal of Wildlife Disease**,v.40, p.311-315, 2004.

MATHIAS, L.A.; GIRIO, R.J.S; DUARTE, J.M.B. Serosurvey against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in Pampas Deer from Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**,v.35, p.112-14, 1999.

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

MIRANDA, J.M.D.; BERNARDI, I.P.; ABREU, K.C.; PASSOS, F.C. Predation on *Alouatta clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae) by *Leopardus pardalis* (Linnaeus) (Carnivora, Felidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22 , p.793-795, 2005.

MONTEIRO, L. A. R.C.; PELLEGRIN, A.O.; ISHIKAWA, M. M.; OSORIO, A. L. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, p. 217-222, 2006.

MUMA, J.B.; SAMUI, K,L.; OLOYA,J.; MUNYEME, M.; SKJERVE, E. Risk factors for brucellosis in indigenous cattle reared in livestock-wildlife interface areas of Zambia. **Preventive Veterinary Medicine**,v.80, p. 306-317, 2007.

MURI, A.F., PIOVEZAN, U., LIMA, T.N., RIBEIRO, D.B., MARTINS, F.I., ORTIZ-MARTÍNEZ, T. Pilhetas: água para o gado e para a fauna no Pantanal da Nhecolândia. **Comunicado Técnico**, 59. Embrapa Pantanal, Corumbá, 2007, 5p.

NICOLETTI, P. A short history of Brucellosis. **Veterinary Microbiology**,v. 80, p. 5-9, 2002.

PAES, R.C.S., RIBEIRO, O.C., CARNEIRO MONTEIRO, L.A.R., FIGUEIREDO, A.O., NETO, A.A.C. OLIVEIRA, J.M., DA ROSA, G.O., KEUROGHLIAN, A. PIOVEZAN, U., HERRERA, H.M. Enfermidades de ocorrência no Porco monteiro (*Sus scrofa*) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. **Suiform Soundings**, v. 9, p.29-34, 2009.

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

PEI, J.; Wu, Q.; Kahl-McDonald, M.; Ficht, T.A. Cytotoxicity in Macrophages Infected with Rough Brucella Mutants Is Type IV Secretion System Dependent. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 30–37, 2008.

PELLEGRIN, A.O; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C.;FIGUEIREDO, H.C.P. Doenças da reprodução em Bovinos no Pantanal: Ocorrência de animais soropositivos para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Diarréia Bovina a vírus e Língua Azul. **Comunicado Técnico**, 20. Embrapa Pantanal,Corumbá, 1997, 7p.

PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R.M.H.; SERENO, J.R.B.; LAGE, A.P.; RAVAGLIA, E. Brucelose bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: Dados Preliminares. **Comunicado Técnico**, 58. Embrapa Pantanal, Corumbá,2006, 4p.

PIOVEZAN,U., ZUCCO, C. A. ROCHA, F. L. Uso de dardos anestésicos para a captura de veados campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal. **Boletim de Pesquisa**, 71. Embrapa Pantanal, Corumbá, 2006, 22p.

PLUMB, G.E.; WHITE, P.J.; COUGHENOUR, M.B.; WALLEN, R.L. Carrying capacity, migration, and dispersal in Yellowstone bison. **Biological Conservation**, v. 142, p. 2377-2387, 2009.

RAGAN,V.E. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. **Veterinary Microbiology**,v.90 , p.11–18, 2002.

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

RHYAN, L.C.; GIDLEWSKI, T.; ROFFE, T.J.; AUNE, K.; PHILO, L.M.; EWALT, D.R. PATHOLOGY of Brucellosis in Bison from Yellowstone National Park. **Journal of Wildlife Diseases**,v.37, p.101-109, 2001.

RODRIGUES, F. H. G.; MEDRI, I.M.; MOURÃO, G.M. Revisão do conhecimento sobre ocorrência e distribuição de Mamíferos do Pantanal. **Documentos**, 38, Embrapa Pantanal, Corumbá, 2002, 41p..

SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Journal Bioscience Reports**, v. 24,p. 237-253, 2004.

SILVA, R.A.M.S.; LIMA, E.S.S. Alterações hematológicas e bioquímicas em quatis (*Nasua nasua*) naturalmente infectados por *Trypanosoma evansi* no Pantanal, MS. **Circular técnica**, 55Embrapa Pantanal, Corumba, 2004, 3p.

SUZÁN, G.; CEBALLOS, G. The role of feral mammals on wildlife infectious disease prevalence in two Nature Reserves within Mexico city limits. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, p 479–484, 2005.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599, 2007. Disponível em < <http://www.kumarlab.net/publications> > Acesso em 14 de agosto de 2010.

TEIXEIRA, B.R.; ROQUE, A.L.R.; BARREIROS-GÓMEZ, S.C.; BORODIN, P.M.; JANSE, A.M.; D'ANDREA, P.S. Maintenance and breeding of *Thrichomys* (Trouessart, 1880) (Rodentia: Echimyidae) in captivity. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 100, p.627-630, 2005.

TESSARO, S. V.; FORBES, J. B. Experimental *Brucella abortus* infection in wolves. **Journal of Wildlife Diseases**, n.40, v.1, p. 60-65, 2004.

UHART, M.M.; VILA, A.R.; BEADE, M.S.; BALCARCE, A. KARESH, W.B. Health Evaluation of Pampas Deer (*Ozotocerus bezoarticus celer*) at Campo Del Tuyú Wildlife Reserve in Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, p.887-893, 2003.

VAN DER LEEK, M.L.; BECKER, H.N.; HUMPHREY, P.; ADAMS, C.L.; BELDEN, R.C.; FRANKENBERGER, W.B.; NICOLLETI, P.L. Prevalence of *Brucella* sp. antibodies in Feral Swine in Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v.29, p.410-415, 1993.

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

WHAGELA, S.; KARSTAD, L. Antibodies to *Brucella* spp. Among Blue Wildbeest an African Buffalo in Kenia. **Journal of Wildlife Diseases**, v 22, p.189-192, 1986.

WHO.[Report of the] Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance **WHO Technical Report Series**, No. 156, 46p , 2003.