

## Avaliação da taxa de infecção por *Brucella* spp. na interface bubalinos e animais silvestres na Amazônia

Luciana Gatto Brito<sup>1</sup>  
Fábio da Silva Barbieri<sup>2</sup>  
Loui de Oliveira Nery<sup>3</sup>  
Maribel Elizabeth Funnes-Huacca<sup>4</sup>  
Paulo Sérgio Ribeiro de Mattos<sup>5</sup>  
Paulo Martins Soares Filho<sup>6</sup>  
Renata Reis da Silva<sup>7</sup>  
Aiesca Oliveira Pellegrin<sup>8</sup>  
Raquel Soares Juliano<sup>9</sup>  
Namor Pinheiro Zimmermann<sup>10</sup>  
Marivaldo Rodrigues Figueiró<sup>11</sup>

Búfalos são bovídeos que apresentam grande capacidade produtiva para carne e leite de qualidade diferenciada quanto a sua composição nutricional quando comparada com bovinos e, adaptam facilmente a diferentes situações edafoclimáticas e topografias, o que os torna uma boa opção pecuária, especialmente em países tropicais.

Embora ainda tímida, a bubalinocultura está se desenvolvendo no país como uma alternativa rentável pelo reconhecimento do potencial nutricional de seus principais produtos, o leite e a carne. A produção e o consumo de leite de búfala vem crescendo em função da demanda por seus derivados lácteos, principalmente os queijos e a

manteiga. Os elevados teores de gordura e sólidos totais no leite de búfala aumentam o rendimento na fabricação de derivados quando comparado ao rendimento industrial do leite de vaca (JORGE et al., 2011). A carne desses animais também é apreciada por conter menores índices de gordura, colesterol, calorias e possui mais proteína e minerais que a dos bovinos (SAMARA et al., 1993). O rebanho bubalino brasileiro está estimado em torno de 1,15 milhão de cabeças, sendo a Região Norte, com 720 mil animais, a maior produtora do País, com destaque para o Pará, que detém 39% do rebanho nacional, seguida das Regiões Nordeste e Sudeste, com 135 e 104 mil cabeças, respectivamente (BRASIL, 2016).

<sup>1</sup> Médica-veterinária, D.Sc em Ciências Veterinárias, Pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO.

<sup>2</sup> Médico-veterinário, D.Sc em Ciências Veterinárias, Pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO.

<sup>3</sup> Acadêmico de Ciências Biológicas do Centro Universitário São Lucas, Bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO

<sup>4</sup> Química, D.Sc. em Química Analítica, docente da Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO.

<sup>5</sup> Médico-veterinário, D. Sc em Ciências Biológicas, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>6</sup> Médico-veterinário, M.Sc em Medicina Veterinária, Fiscal Federal Agropecuário do Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG.

<sup>7</sup> Química, M.Sc. em Química dos Recursos Naturais, Técnica, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO.

<sup>8</sup> Médica-veterinária, D.Sc. em Ciência Animal, Pesquisadora da Embrapa Pantanal, Corumbá, MS.

<sup>9</sup> Médica veterinária, D.Sc. em Sanidade Animal, Pesquisadora da Embrapa Pantanal, Corumbá, MS.

<sup>10</sup> Médico-veterinário, D.Sc. em Ciência Animal, Autônomo, Campo Grande, MS

<sup>11</sup> Médico-veterinário, M.Sc em Medicina Veterinária, Analista A, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

O contato de búfalos com bovinos ou outros animais de vida selvagem, consequência do padrão extensivo da bubalinocultura que promove o acesso de bubalinos a diversos ecossistemas, aliado ao hábito dos búfalos de banharem-se em coleções de águas em busca da termorregulação propiciam maior exposição dos animais a diferentes agentes etiológicos patogênicos, inclusive à *Brucella* spp. (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008). A brucelose continua sendo uma das zoonoses mais comuns em todo o mundo (ACHA; SZYFRES, 2003). Além de se tratar de um problema de saúde pública, a brucelose em animais de produção determina perdas econômicas significativas aos rebanhos, uma vez que causam problemas reprodutivos, redução na produção de leite (SELEEM et al., 2010) e, restrições de trânsito animal e comerciais, impostas por regulamentações nacionais e internacionais (BRASIL, 2006 ; GODFROID et al., 2010).

A brucelose em búfalos é causada por *Brucella abortus* e a sintomatologia clínica indicativa de uma possível infecção envolve a ocorrência de aborto predominantemente no terceiro trimestre de gestação, o nascimento de bezerros não viáveis, a infertilidade e a redução na produção de leite (NIELSEN; DUNCAN, 1990). No Brasil, a brucelose em bovídeos é endêmica em vários estados e regiões, sendo que a ocorrência de abortos no terço final da gestação é considerada uma importante evidência da presença da infecção nos rebanhos (MEGID et al., 2005; POESTER et al., 2009).

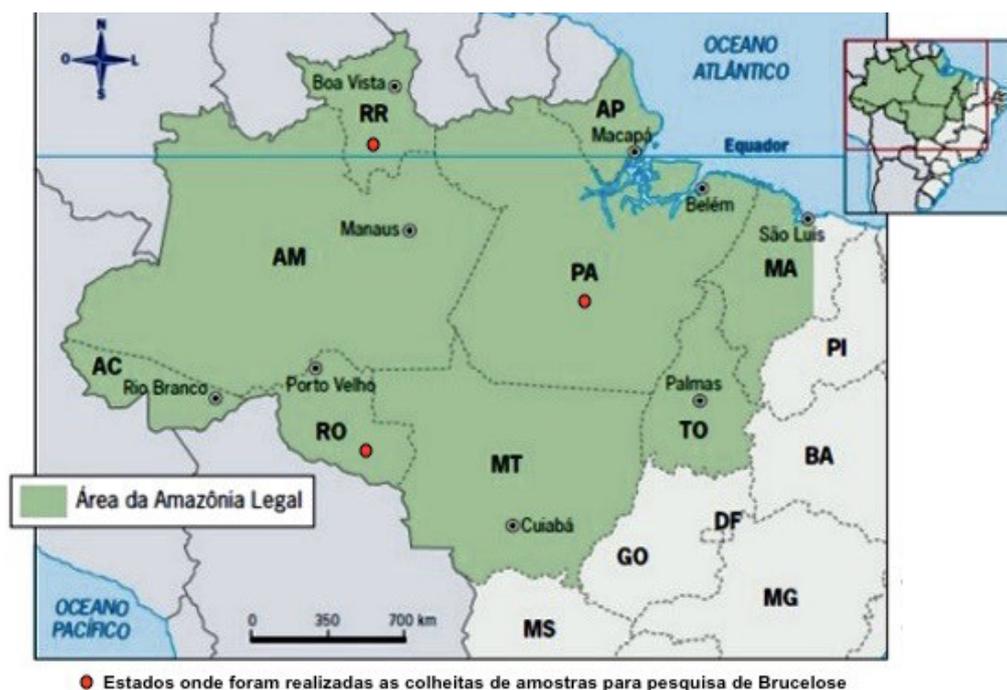
Doenças de animais silvestres são preocupações crescentes em todo o mundo, uma vez que, representam uma ameaça às próprias populações selvagens e, afetam também animais domésticos e populações humanas. Dado ao novo contexto da globalização, observa-se uma intensa movimentação de animais e produtos de origem animal via comércio internacional. O aumento da população humana estreitamente associado a intensificação do desflorestamento e a antropização de áreas silvestres, aliados às alterações climáticas e novos hábitos sociais e de exploração econômica como a presença de animais exóticos como animais de companhia ou de produção acabam por viabilizar

um maior contato entre animais silvestres, animais domésticos e humanos (VALLAT, 2008). Para a World Organisation for Animal Health/OIE (TRAINING..., 2010) a vigilância das doenças animais selvagens é tão importante quanto a vigilância e controle de doenças em animais domésticos, pois as espécies da vida selvagem, muitas vezes agem como sentinelas.

Buscando contribuir com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com informações que possam auxiliar no estabelecimento de diretrizes que auxiliem no controle e na erradicação da brucelose nos rebanhos bovídeos, avaliou-se a taxa de infecção de *Brucella* spp. na interface bubalinos e animais silvestres estabelecidos no bioma Amazônia, o que poderá permitir uma gestão eficaz e maior controle da brucelose nos rebanhos bovídeos domésticos.

## Obtenção de amostras para pesquisa de *Brucella* spp.

Amostras de sangue foram colhidas de búfalos estabelecidos em áreas que permitem um estreito convívio desses animais com espécies silvestres nos estados de Rondônia (n = 82) e Pará (n = 88). Amostras de sangue, tecido e fluídos foram colhidas de diferentes espécies silvestres capturadas nos estados de Rondônia (n = 34), Pará (n = 6) e Roraima (n = 13) (Tabela 1). Todas as amostras podem ser consideradas de conveniência, uma vez que foram obtidas a partir de animais resgatados na área de influência de reservatórios de usinas hidroelétricas. Todas as amostras foram colhidas a partir da emissão da Autorização para atividades com finalidade científica (Números 43144 e 49138) pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e anuência da Diretoria de Licenciamento Ambiental da Coordenação de Energia Hidrelétrica do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.



● Estados onde foram realizadas as coletas de amostras para pesquisa de Brucelose

Fonte: Nova Escola (2016), adaptado pelos autores.

**Figura 1.** Estados onde foram realizadas as coletas de amostras biológicas para pesquisa de *Brucella* spp. na Amazônia.

**Tabela 1.** Amostras biológicas utilizadas na pesquisa de *Brucella* spp. em animais silvestres.

Espécie	Nome vulgar	Tipo de Amostras	Número de Amostras	Estado
<i>Choloepus didactylus</i>	Preguiça-real	Soro	5	RO
<i>Choloepus didactylus</i>	Preguiça-real	Sangue total	4	RO
<i>Choloepus didactylus</i>	Preguiça-real	Urina	1	RO
<i>Choloepus didactylus</i>	Preguiça-real	Rim	1	RO
<i>Pithecia irrorata</i>	Macaco-velho	Sangue total	2	RO
<i>Pithecia irrorata</i>	Macaco-velho	Soro	2	RO
<i>Pithecia irrorata</i>	Macaco-velho	Urina	1	RO
<i>Pithecia irrorata</i>	Macaco-velho	Linfonodo	1	RO
<i>Pithecia irrorata</i>	Macaco-velho	Baço	1	RO
<i>Pithecia irrorata</i>	Macaco-velho	Rim	1	RO
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	Soro	7	RO
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	Sangue total	8	RO
<b>Total Rondônia</b>			<b>34</b>	
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	Soro	3	PA
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	Sangue total	3	PA
<b>Total Pará</b>			<b>6</b>	
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	DNA obtido de sangue total	13	RR
<b>Total Roraima</b>			<b>13</b>	
<b>Total Amostras</b>			<b>53</b>	

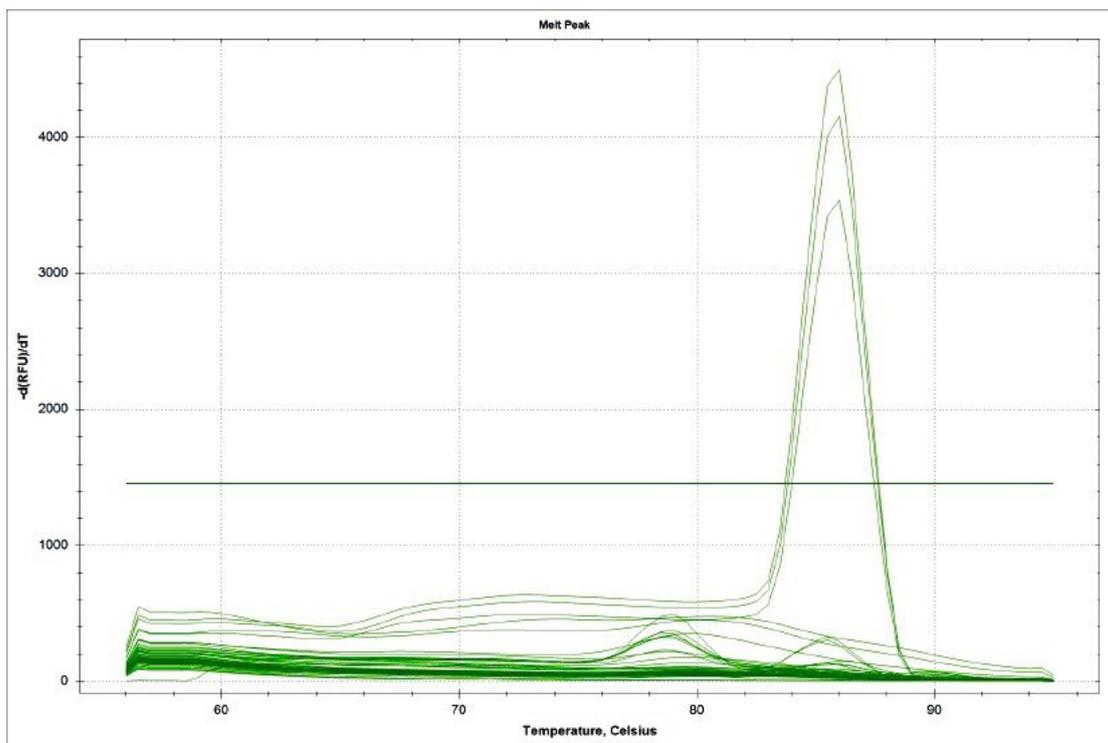
## Desenvolvimento da prova molecular em tempo real (qRT-PCR) para o diagnóstico de *Brucella* spp.

Para a padronização do diagnóstico de *Brucella* spp. por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), foi utilizada amostra inativada de *B. abortus* proveniente de cultura celular fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais - LANAGRO/MG. Após a padronização da prova diagnóstica em qRT-PCR, utilizou-se como amostra controle interno positivo em cada uma das provas diagnósticas uma amostra comercial de *B. abortus* (cepa vacinal B19) obtidas a partir da vacina liofilizada (Labovet Produtos Veterinários Ltda, Feira de Santana, BA, Brasil).

A extração de DNA de sangue, fluídos corporais e tecidos foi realizada com o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Co., cat number:

A1125) seguindo-se as recomendações do fabricante. A pesquisa de *Brucella* spp. foi realizada utilizando-se os *primers* B4 (5' -TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3) e B5 (5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3), descritos por BAILY et al. (1992) que amplifica um fragmento de 223 pares de base do gene que codifica a proteína antigênica BCSP31 de *B. abortus* de 31 KDa.

Os ensaios em tempo real foram otimizados em reações de PCR *singleplex* utilizando-se o corante de ligação de DNA Eva-Green™ (*SoFast EvaGreen kit*, BioRad). Para a avaliação da especificidade da reação quantitativa de PCR em tempo real (qPCR), foram consideradas as menores concentrações de *primers* e cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) capazes de gerar os maiores picos de fluorescência e os menores ciclos liminares de amplificação (threshold cycle – Ct) e análise da resolução dos picos das curvas de *melting* (Figura 2).



**Figura 2.** Avaliação da especificidade do ensaio PCR *singleplex* em tempo real para o diagnóstico de *Brucella* spp. utilizando a amostra controle de *Brucella abortus*<sup>1</sup>.

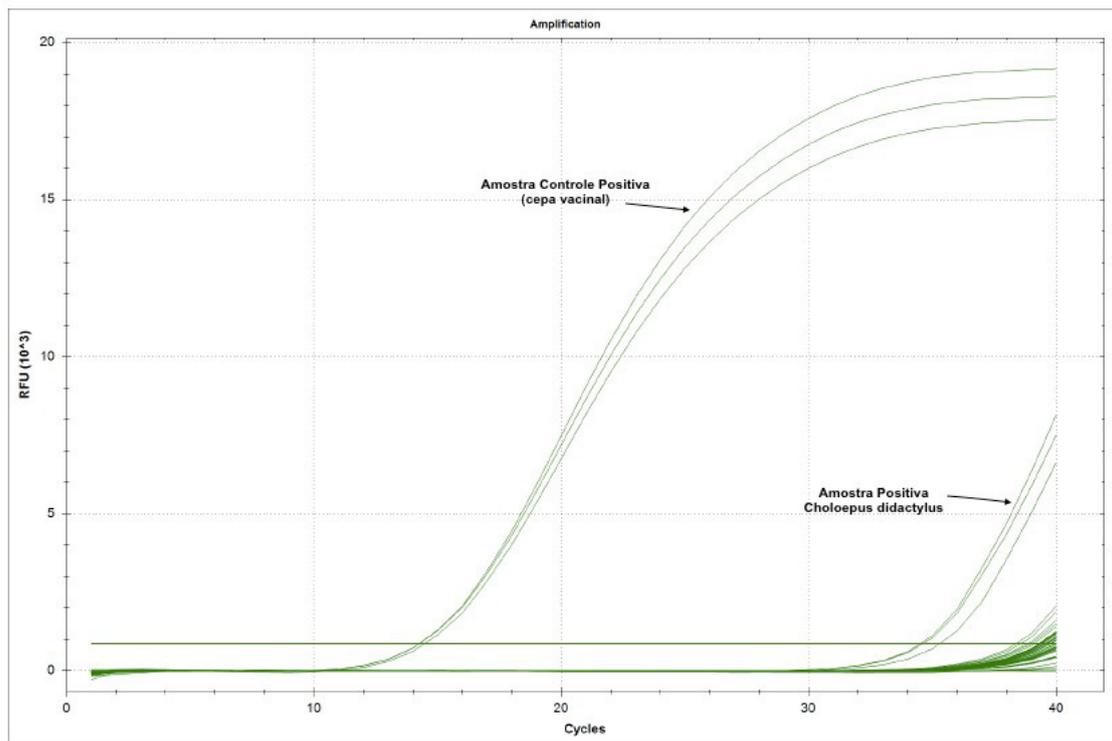
<sup>1</sup> Amostra proveniente de cultura celular mantida pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Minas Gerais.

Cada ensaio *singleplex*-PCR em tempo real foi realizado em um volume de reação de 20  $\mu$ l contendo: 2X SsoFast™ *EvaGreen*® *Supermix* (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA), 100 ng de DNA e 0,5  $\mu$ M de cada um dos *primers*. A amplificação foi realizada utilizando o sistema de detecção CFX 96 (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), e a reação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C durante 90 segundos e 39 ciclos com 95°C durante 5 segundos, 56°C durante 20 segundos, seguida de um arrefecimento final a 4°C durante um minuto. Uma curva de fusão (*melting curve*) foi padronizada a partir de uma rampa de temperatura de anelamento variável de 55°C a 65°C com aumento de 2°C/segundo. As amostras obtidas de bubalinos e animais silvestres foram avaliadas em triplicata. Em todas as baterias de análise, foi utilizada água

ultrapura em igual volume de DNA como controle negativo e DNA obtido a partir da cepa vacinal B19 como controle positivo.

### Infecção por *Brucella* spp. em bubalinos e animais silvestres na Amazônia

A análise por qRT-PCR para a pesquisa de *Brucella* spp. nas amostras biológicas de bubalinos e animais silvestres colhidas na Amazônia utilizando os *primers* B4/B5 possibilitou a identificação de uma amostra infectada, correspondente ao soro de *Choloepus didactylus* (preguiça-real) colhida no Estado de Rondônia (Figura 3). Nenhuma das amostras biológicas de búfalos avaliadas foi positiva para *Brucella* spp.



**Figura 3.** Diagnóstico molecular em reação da cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) para o diagnóstico de *Brucella* spp. em amostras de animais silvestres colhidas no Estado de Rondônia.

Em virtude da natureza das amostras obtidas de animais silvestres, que por se tratarem de amostras por conveniência não permitem a generalização dos resultados, mas evidenciam uma baixa infecção por *Brucella* spp. nas populações silvestres amazônicas. A não identificação por qRT-PCR de bubalinos infectados por *Brucella* spp. demonstra que a fauna silvestre amazônica não representa risco à dispersão do agente infeccioso aos bubalinos. A baixa prevalência de infecção por *Brucella* spp. nas populações silvestres que compartilham ecossistemas com rebanhos bovídeos na Amazônia demonstra uma participação não significativa dessas populações na epidemiologia da doença na Amazônia. Maiores esforços de pesquisa são necessários para que se ampliem as colheitas de amostras biológicas, assim como as espécies da fauna silvestre brasileira envolvidas na manutenção da infecção com o propósito de apoiar e subsidiar o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose com dados epidemiológicos que possibilitem a tomada de decisões e o progresso do Programa no país.

## Referências

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3 ed. Washington, USA: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p. 28-56.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B. ; DRASAR, B. S.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 271-275, 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT): manual técnico**. Brasília, DF:MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.
- BRASIL. Ministério do Abastecimento, Pecuária e Agricultura. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos> > Acesso em: 23 jul. 2016.
- GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of Brucellosis in livestock and wildlife. **Croatian Medical Journal**, v. 51, n. 4, p. 296-305, 2010.
- JORGE, A.M.; COUTO, A.G.; CRUDELI, G.A.; PATIÑO, E.M. **Produção de búfalos de leite**. Botucatu: FEOAF; 2011. 101 pp.
- MEGID, J.; ALBERT, D.; FAGLIARI, J. J.; PAES, A. C.; LISTONI, F. P.; PINTO, M. R. A.; RIBEIRO, M. G.; THIÉBAUD, M.; UENO, T.; GARIN-BASTIJI, B. *Brucella abortus* isolated from cattle and water buffalo in Brazil. **Veterinary Record**, v. 156, n. 5, p. 147-148, 2005.
- NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press; 1990. 453pp.
- NOVA Escola. Área da Amazônia Legal. Disponível em: < <http://rede.novaescolaclube.org.br/sites/default/files/importadas/img/geral/mapa-veja-06.jpg> > . Acesso em: 23 jul. 2016.
- PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 389-401, jul./set. 2008.
- POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A.P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos da prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, Supl. 1, p. 1-5, 2009.
- SAMARA, S. I.; DUTRA, I. S.; FRANCESCHINI, P. H.; MOLERO FILHO, J. R.; CHACUR, M. G. M. **Sanidade e produtividade em búfalos**. Jaboticabal: FUNEP; 1993. 201 pp.
- SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN,

N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 392-8, 2010.

TRAINING manual on wildlife diseases and surveillance. Paris: World Organisation for Animal Health - OIE, 2010. Workshop for OIE National Focal Points for Wildlife. Disponível em: < [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International\\_Standard\\_Setting/docs/pdf/WGWildlife/A\\_Training\\_Manual\\_Wildlife.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/WGWildlife/A_Training_Manual_Wildlife.pdf) > . Acesso em: 23 jul. 2016.

VALLAT, B. Animal Health and Poverty. World Organisation for Animal Health (OIE) Rio de Janeiro, Brazil, 2008.

**Comunicado Técnico, 404**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Rondônia**

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127,  
CEP 76815-800, Porto Velho, RO.

Fone: (69)3219-5004

Telefax: (69)3222-0409

[www.embrapa.br/rondonia](http://www.embrapa.br/rondonia)

[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



1ª edição

1ª impressão (2016): 100 exemplares

**Comitê de Publicações**

**Presidente:** César Augusto Domingues Teixeira

**Secretário:** Henrique Nery Cipriani

**Membros:** Marília Locatelli

Rodrigo Barros Rocha

José Nilton Medeiros Costa

Ana Karina Dias Salman

Luiz Francisco Machado Pfeifer

Fábio da Silva Barbieri

Wilma Inês de França Araújo

**Expediente**

**Normalização:** Daniela Maciel Pinto

**Revisão de texto:** Wilma Inês de França Araújo

**Editoração eletrônica:** Gramma Editora