MAYRA PEREIRA ROCCA

**Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*)
de vida livre, procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de
Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil**

São Paulo
2014

MAYRA PEREIRA ROCCA

**Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre,
procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas,
Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Lara Borges Keid

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2982
FMVZ

Rocca, Mayra Pereira

Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil / Mayra Pereira Rocca. -- 2014.
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lara Borges Keid.

1. Brucelose . 2. *Inia geoffrensis*. 3. Diagnóstico sorológico. 4. Cultivo microbiológico. 5. Reação em cadeia pela polimerase. I. Título.

ERRATA

ROCCA, Mayra Pereira . Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil . 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3º	89 f.	88 f.
RESUMO	1º	faculdade	Faculdade
RESUMO	1º	(mestrado em ciências)	(Mestrado em Ciências)
ABSTRACT	1º	faculdade	Faculdade
ABSTRACT	1º	(mestrado em ciências)	(Mestrado em Ciências)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de infecção por *Brucella spp* em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, procedentes da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil", protocolado sob o nº 2556/2012, utilizando 80 (oitenta) botos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Lara Borges Keid, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/4/2012.

We certify that the Research "Evaluation of the occurrence of *Brucella spp* infection in free living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from the Mamirauá Sustainable Development Reserve (RDSM), Tefé, Amazonas, Central Amazon, Brazil", protocol number 2556/2012, utilizing 80 (eighty) botos, under the responsibility Profa. Dra. Lara Borges Keid, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/11/2012.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROCCA, Mayra Pereira

Título: Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Carlos e Wilma, por todo amor, exemplo, incentivo, compreensão e apoio que me deram desde sempre. Vocês são tudo para mim.

Aos meus irmãos, Diego e Camila. Que nosso companheirismo e amizade nos mantenham sempre unidos e próximos, vocês também são meus exemplos;

À minha querida Vó Valesca por todo amor, carinho e atenção que sempre me deu durante toda minha vida;

O quanto vocês são importantes na minha vida é simplesmente inexplicável. Agradeço muito pela família linda e amada que eu tenho.

Agradecimentos:

A minha orientadora, Profa. Lara Borges Keid, pela paciência, dedicação e pela ajuda durante todo o mestrado.

Ao Prof. Rodrigo Martins Soares, por ter me recebido tão bem em seu laboratório em Pirassununga, pelo suporte, e pelo auxílio em muitas partes desse projeto.

À Dra. Vera Maria Ferreira da Silva, pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a todos da equipe do projeto Boto;

Aos Professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por se mostrarem sempre abertos e dispostos a qualquer ajuda e atenção, foram fundamentais no meu aprendizado.

Aos funcionários do VPS de Pirassununga João Metzner, Ni, Seu Antônio e Ceíça pela amizade, pelos bons momentos de convivência e pelo auxílio durante meu trabalho;

Aos amigos do VPS, Jaqueline Diniz, Fernanda Koga, Estella Galucci, Vanessa Figueredo, Graziela Benvenga e Samantha Valadas, por toda amizade e companheirismo. Em especial, Daniela Chiebao que foi mais do que uma amiga e companheira, foi minha irmã e conselheira; devo muito a você.

Aos secretários do VPS, Cris e Virgínia. E Danival, que merece meu agradecimento especial por toda orientação, ajuda e amizade.

A todos funcionários da FMVZ, FZEA Campus USP de Pirassununga;

A FAPESP, por ter me concedido a bolsa de mestrado;

Um agradecimento especial:

A minhas queridas amigas Priscila, Renata e Tamie, veterinárias amadas que sempre pude contar, tanto nas horas difíceis e de sufoco, assim como nas horas divertidas. Eu amo vocês.

Aos meus amigos e amigas de infância, que mesmo sem ter a menor ideia do que eu estava fazendo, sempre me deram força e incentivo, acreditando em mim.

Aos amigos de pós-graduação de Pirassununga do VPS, VRA e VNP pelos bons momentos de convivência, fizeram da minha estadia em Pira muito mais divertida.

Muito obrigada!

RESUMO

ROCCA, M. P. **Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil.** [Detection of *Brucella* spp. in free-living Amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*) in Mamiraua Reserve, in Tefé, Amazonas, Brazil]. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Vem se verificando uma crescente preocupação por parte de diversos países e de órgãos internacionais de saúde e conservação animais quanto à necessidade de monitoramento da ocorrência e da distribuição de enfermidades infecciosas em populações de animais silvestres, devido ao potencial destas doenças de causarem impacto na dinâmica e conservação de espécies silvestres, na saúde dos animais domésticos e na saúde pública. A ocorrência de brucelose vem sendo relatada em diversas espécies de mamíferos marinhos, em vários centros de pesquisa no mundo, contudo, não há dados na literatura científica sobre a ocorrência desta infecção em mamíferos aquáticos fluviais brasileiros. Nos cetáceos, a brucelose é causada pela *Brucella ceti*, sendo associada a problemas reprodutivos, quadros de meningoencefalite e infecções em tecidos linfóides. Assim, o presente trabalho teve como objetivo pesquisar a ocorrência de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos de vida livre da Amazônia (*Inia geoffrensis*), procedentes da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil. A pesquisa foi realizada em animais de vida livre, de ambos os sexos e várias idades, sendo realizadas duas expedições para colheita de amostras, nos anos de 2010 e 2011. De cada animal foram coletadas amostras de sangue, leite e suaves genital, anal, nasal, oral e de eventuais lesões cutâneas apresentadas. Um total de 161 animais foi capturado. A detecção de anticorpos séricos anti-*Brucella* foi realizada utilizando-se as provas de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) e o teste de polarização fluorescente (PF). As amostras de leite e de suaves foram submetidos ao cultivo microbiológico e à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção direta de *Brucella* spp. As colônias bacterianas que apresentaram características morfológicas compatíveis com *Brucella* spp. foram identificadas pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando-se os *primers* específicos para detecção do gênero *Brucella*, direcionados ao DNA codificador da região

interespacedora do RNA ribossomal de *Brucella* (PCR-ITS). As amostras que apresentaram resultados positivos, foram caracterizadas quanto ao gene *recA* pela amplificação (PCR-recA) e posterior sequenciamento do produto amplificado. A PCR-ITS também foi empregada para o diagnóstico direto das infecções por *Brucella* spp. nas amostras de sangue, leite e suabes, as quais foram caracterizadas da mesma forma que as colônias bacterianas isoladas. As 67 amostras de soros colhidas apresentaram resultados negativos nos testes de AAT, PF e IDGA. Das 369 amostras submetidas ao cultivo microbiológico, duas amostras de suabe apresentaram características compatíveis com o gênero *Brucella* e resultados positivos pela PCR-ITS. Uma delas foi identificada como pertencendo à espécie *Ochrobactrum intermedium*. A segunda amostra não pôde ser caracterizada por não ter sido obtida em cultura pura. Das 118 amostras de sangue total analisadas pela PCR-ITS, seis (7,08%) apresentaram resultados positivos. Das 248 amostras de suabes analisadas pela PCR-ITS, uma (0,4%) apresentou resultado positivo. Das 29 amostras de leite analisadas pela PCR-ITS, cinco (17,24%) apresentaram resultados positivos. Considerando os 128 animais amostrados, 11 (8,59%) apresentaram resultado positivo pela PCR-ITS em pelo menos uma amostra testada. Das 12 amostras biológicas que apresentaram resultados positivos pela PCR-ITS e foram submetidas à PCR-recA, apenas duas apresentaram o produto amplificado no tamanho esperado. De acordo com a análise filogenética utilizada, uma delas apresentou similaridade aos microrganismos *Cellulomonas fimi*, *Cellulomonas flavigena* e *Cellvibrio gilvus*. A segunda amostra foi agrupada juntamente com as bactérias *Propionimonas paludicola*, *Micropruina glycogenica*, *Naumannella halotolerans* e *Propionibacterium propionicum* com maior proximidade com a espécie *P. propionicum*. De acordo com os resultados apresentados, não foi evidenciada a ocorrência de infecções por *Brucella* spp. na população amostrada pelos métodos sorológicos e microbiológicos. Foi isolada uma estirpe de *Ochrobactrum intermedium* de um exemplar da espécie *Inia geoffrensis*, contudo, a importância sanitária destes resultados para esta espécie de boto não pôde ser determinada.

Palavras-chave: Brucelose. *Inia geoffrensis*. Diagnóstico sorológico. Cultivo microbiológico. Reação em cadeia pela polimerase.

ABSTRACT

ROCCA, M. P. **Detection of *Brucella* spp. in free-living Amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*) in Mamiraua reserve, in Tefé, Amazonas, Brazil.** [Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil]. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

There is a growing concern among several countries and international institutions of animal health and conservation regarding the surveillance of infectious diseases in wildlife populations, because these infections may cause impact on the dynamics and conservation of wildlife species, as well as on the health of livestock and public health. Brucellosis has been reported in several species of marine mammals in various research centers worldwide. However, there is no data about the occurrence of brucellosis in aquatic mammals in Brazil. Brucellosis in cetacean is caused by *Brucella ceti* and has been associated to reproductive problems, meningoencephalitis and lymphoid tissues infections. The objective of this study was to investigate the occurrence of *Brucella* spp. infection in free living amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*), from Mamirauá Sustainable Development Reserve, in Tefé municipality, Amazonas State, Brazil. Samples were collected from free-living animals from both sexes and different ages during two expeditions, in 2010 and 2011. Samples of serum, whole blood and milk as well as genital, anal, nasal, oral and cutaneous lesions swabs were collected. One hundred and sixty one animals were samples. Serodiagnosis was performed using the acidified buffered antigen test (ABAT), the 2-mercaptoethanol (2ME) test and the fluorescent polarization assay (FPA). Milk and swabs samples were submitted to microbiological culture and polymerase chain reaction (PCR) to the direct diagnosis of *Brucella* spp. Bacterial colonies showing morphologies compatible with *Brucella* spp. were tested by a PCR using specific primers directed to the 16S-23S interpace region of the ribosomal DNA of *Brucella* (ITS-PCR). Samples with positive results by ITS-PCR were amplified using primers specific to the gene *recA* (PCR-recA), and the amplicon was sequenced. ITS-PCR was also used to diagnosis of *Brucella* spp. infections directly in samples of blood, milk and swabs which were characterized as the bacterial colonies. All 67 serum samples were negative in the three serological tests used. Eleven of the 128 (8.59%) animals showed

positive results by ITS-PCR in at least one biological sample. Of the 369 samples tested by microbiological culture, two had positive results in ITS-PCR. According to the characterization of *recA* gene, one of them was identified as *Ochrobactrum intermedium* and the other sample could not be characterized because it was not isolated in pure culture. Of the 118 whole blood samples, six (7.08%) were positive by ITS-PCR. Five of the 248 (17.24%) milk samples and one of the 248 (0.4%) swab samples were positive by ITS-PCR. Of the 12 positive samples by ITS-PCR, only two were amplified by the *recA*-PCR and sequenced. According to the phylogenetic analysis, one sample clustered with *Cellulomonas fimi*, *Cellulomonas flavigena* e *Cellvibrio gilvus* group showing major similarity with *C. fimi*. The other sample clustered with the bacteria *Propionicimonas paludicola*, *Micropruina glycogenica*, *Naumannella halotolerans*, being more similar to *Propionibacterium propionicum*. An *Ochrobactrum intermedium* strain was isolated from a dolphin, however, the sanitary importance of the detection could not be determined.

Keywords: Brucellosis. *Inia geoffrensis*. Serological diagnosis. Microbiological culture. Polymerase chain reaction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número e categoria de amostras coletadas – São Paulo, 2014.....	34
Tabela 2-	Seqüência dos <i>primers</i> empregados direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2014.....	41
Tabela 3 -	<i>Primers</i> bacterianos universais para a identificação de isolados, direcionados ao gene 16S. São Paulo - 2014.....	42
Tabela 4 -	Seqüência dos <i>primers</i> empregados para a identificação de isolados bacterianos, direcionados ao gene <i>recA</i> . São Paulo - 2014	43
Tabela 5 -	Mistura de reagentes para a reação de sequenciamento automático de ácidos nucléicos - São Paulo 2014	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Amostras de DNA extraídas de sangue de botos da espécie <i>Inia geoffrensis</i> , amplificadas pelos <i>primers</i> ITS66 e ITS279, direcionados à região interespaçadora do RNA ribossomal de <i>Brucella</i> spp., gerando um produto amplificado de 214 pb.	55
Figura 2 -	Reconstrução filogenética com inferência pelo método <i>Neighborn-joining</i> e teste de <i>bootstrap</i> com 1000 réplicas. Utilização de 495 nucleotídeos do gene codificador da recombinase (<i>recA</i>). Foi incluído apenas um representante de cada alelo de <i>Ochrobactrum</i> e <i>Brucella</i> . Árvore gerada com o programa MEGA.	58
Figura 3 -	Reconstrução filogenética com inferência pelo método <i>Neighborn-joining</i> e teste de <i>bootstrap</i> com 1000 réplicas. Utilização de sequência de aminoácidos da enzima recombinase (<i>RECA</i>). Foi incluído apenas um representante de cada alelo de <i>Ochrobactrum</i> e <i>Brucella</i> . Árvore gerada com o programa MEGA.	60
Figura 4 -	Reconstrução filogenética com inferência pelo método <i>Neighborn-joining</i> e teste de <i>bootstrap</i> com 1000 réplicas. Utilização de sequência de aminoácidos da enzima recombinase (<i>RECA</i>). Foi incluído apenas um representante de cada alelo de <i>Ochrobactrum</i> e <i>Brucella</i> . Árvore gerada com o programa MEGA.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2ME = teste do 2-mercaptoetanol
AAT = antígeno acidificado tamponado
cm = centímetros
dATP = desoxi-adenosina trifosfato
dCTP = desoxi-citosina trifosfato
dGTP = desoxi-guanosina trifosfato
dTTP = desoxi-timidina trifosfato
DNA = ácido desoxirribonucléico
EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA = ensaio imunoenzimático
g = grama
g = gravidade
IDGA = imunodifusão em gel de ágar
ITS = *internal transcribed sequence*
IUCN = *International Union for Conservations of Nature*
Kg = quilograma
kDa = kilodalton
L = litro
LPS= lipopolissacarídeos
M = molar (mol por litro)
mg = miligrama
MgCl₂ = cloreto de magnésio
mL = mililitro
mm = milímetro
μM = micromolar
mM = milimolar
μg = micrograma
μL = microlitro
NaCl = Cloreto de sódio
nm = nanômetro
O-LPS = lipopolissacarídeo O
Omp31 = outer membrane protein 31
Omp 2a = *olfactory marker protein 2a*
Omp 2b = *olfactory marker protein 2b*
bp = base pair (pares de bases)
PCR = reação em cadeia pela polimerase
pg = picograma
pH = potencial hidrogeniônico
RNA = ácido ribonucléico

rpm = rotações por minuto

SAL = prova de soroaglutinação lenta

SAM = soroaglutinação modificada

SAR = soroaglutinação rápida em placa

SAT = soroaglutinação em tubos

Taq = *Thermus aquaticus*

TBE = tris-borato-EDTA

TE = tampão Tris-EDTA

TFP = teste de polarização fluorescente

TRIS = Tris (hidroximetil) amino metano

Tris HCl = Tris (hidroximetil) amino metano com ácido clorídrico

Tris-borato = Tris (hidroximetil) amino metano com borato

UI = unidade internacional

V = volts

X= vezes

% = porcentagem

°C = graus celcius

+ = positivo

- = negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 CETÁCEOS FLUVIAIS BRASILEIROS.....	20
2.2 BRUCELOSE.....	22
2.3 BRUCELOSE EM CETÁCEOS.....	24
3 OBJETIVOS.....	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 ANIMAIS E ÁREA DE ESTUDO.....	32
4.2 AMOSTRAS PADRÃO.....	34
4.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE INFECÇÃO POR <i>BRUCELLA</i> SPP.	34
4.4 CULTIVO MICROBIOLÓGICO PARA ISOLAMENTO DE <i>BRUCELLA</i> SPP.	36
4.4.1 Identificação morfológica das colônias bacterianas isoladas.....	36
4.4.2 Identificação molecular das colônias isoladas.....	37
4.4.3 Extração de ácidos nucléicos de colônias bacterianas.....	38
4.4.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificação das colônias bacterianas.....	39
4.5 PRIMERS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	40
4.5.1 Primers direcionados à região interespaçadora do gene codificador do RNA ribossomal de <i>Brucella</i> spp. (PCR-ITS).....	40
4.5.2 Primers direcionados ao gene <i>recA</i> (PCR-BruOchro).....	41
4.5.3 Primers direcionados ao gene <i>recA</i> (PCR- <i>recA</i>).....	42
4.5.4 Visualização dos produtos amplificados.....	44
4.5.5 Purificação dos produtos amplificados.....	44
4.6 SEQUENCIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	45
4.6.1 Purificação de DNA pós-sequenciamento.....	46
4.6.2 Análise das sequências obtidas.....	47
4.7 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA.....	47
4.8 DETECÇÃO DIRETA DE <i>BRUCELLA</i> EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	47
4.8.1 Extração de DNA das amostras biológicas de botos.....	48
4.8.2 Reação de amplificação de ácidos nucléicos extraídos (PCR) para detecção de <i>Brucella</i> spp. em amostras biológicas de botos.....	52
4.8.3 Caracterização dos produtos amplificados em amostras biológicas de botos.....	53
4.8.4 Análise das sequências obtidas.....	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE INFECÇÃO POR <i>BRUCELLA</i> SPP.	54
5.2 CULTIVO MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	54
5.3 DETECÇÃO DE <i>BRUCELLA</i> SPP. EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE BOTOS.....	55
5.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	57
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES.....	72
8 REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, considera-se que a saúde humana está intimamente relacionada à saúde animal e ambiental, de forma que a manutenção da saúde nas várias esferas requer uma abordagem multidisciplinar, num conceito conhecido como “Uma Saúde, Uma Medicina” (*One Health, One Medicine*) (BOSSART, 2011).

O interesse em doenças que acometem a fauna silvestre vem aumentando significativamente desde a segunda guerra mundial, impulsionado principalmente pela descoberta de espécies silvestres atuando como reservatórios de doenças infecciosas transmissíveis a humanos e animais domésticos. Atualmente, a preocupação vem crescendo, por parte de diversos países e de órgãos internacionais de saúde e conservação animais, quanto à necessidade de monitoramento da ocorrência e da distribuição de enfermidades infecciosas em populações de animais silvestres. Estudos desta natureza são importantes pela possibilidade de elucidar formas de transmissão de enfermidades, de prever o impacto populacional das doenças e prevenir a emergência de novas enfermidades. Desde 1993, o Grupo de Trabalho em Doenças de Animais Silvestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) vem demonstrando especial interesse na vigilância de doenças de animais silvestres, a qual vem sendo realizada em diversos países (OIE, 2011).

As enfermidades infecciosas que ocorrem na fauna silvestre podem acarretar não só impacto na dinâmica e conservação de determinadas populações, mas também impactos na saúde dos animais domésticos e na saúde pública (SCHWABE, 1969). Do ponto de vista conservacionista, conhecer os microrganismos patogênicos que circulam naturalmente nestas populações é importante, pois possibilita a elucidação de formas de transmissão e de fatores de risco associados à ocorrência destas enfermidades, permitindo entender e prever seu impacto na estrutura de populações silvestres. A emergência de enfermidades em populações silvestres pode estar relacionada a alterações antropogênicas nos ecossistemas dos hospedeiros, dos agentes patogênicos ou de ambos (DASZAK et al., 2000).

Alterações climáticas, poluição, degradação ou fragmentação de ecossistemas e o aumento da densidade humana invadindo ambientes selvagens podem alterar as relações entre predadores, presas, competidores e recicladores e conseqüentemente a epidemiologia e enfermidades infecciosas (VAN BRESSEN et al., 2009; BOSSART, 2011; WALTZEK et al., 2012). A transmissão de enfermidades infecciosas oriundas de populações humanas ou de animais domésticos para espécies silvestres pode ocorrer, causando epizootias com graves consequências à dinâmica e conservação destas espécies animais, acarretando, em muitos casos alta mortalidade, declínio populacional e o inclusive a extinção de espécies ameaçadas (EPSTEIN et al., 2003; RANDOLPH, 2009; SLENNING, 2010).

Estudos recentes têm enfatizado a importância de espécies selvagens, tanto no surgimento de novas infecções quanto na reemergência de patógenos humanos já conhecidos (WALTZEK et al., 2012). Estima-se que 75% de patógenos humanos são zoonóticos e a incidência de doenças associadas a eles vem aumentando (DASZAK et al., 2000; BENGIS et al., 2002; WILLIAMS et al., 2002; CUNNINGHAM, 2005).

Organismos aquáticos podem atuar como sentinelas para avaliação da saúde do ecossistema aquático. Mamíferos aquáticos são descritos como principais sentinelas pelo fato de apresentarem expectativa de vida longa, residirem um longo período na costa e possuírem depósitos de gorduras que podem armazenar compostos químicos e toxinas (AGUIRRE et al., 2004; JESSUP et al., 2004). Além disso, são considerados animais carismáticos, estimulando um grande interesse humano. O contato entre humanos e animais aquáticos vem aumentando, assim como as iniciativas voltadas à conservação e a realização de pesquisas com o objetivo de se melhorar o conhecimento referente à biologia destas espécies (BOSSART, 2011).

As comunidades costeiras estão em constante expansão, aumentando o risco de poluição e degradação de habitats aquáticos e também as oportunidades de encontros entre humanos e espécies selvagens. Verifica-se também um aumento no número de centros de reabilitação, aquários e centros de pesquisa, voltados à preservação de determinadas espécies. Este contato acarreta impactos à saúde do ambiente aquático e também riscos de transmissão de zoonoses aos humanos.

Embora as zoonoses de mamíferos aquáticos ainda sejam pouco conhecidas, uma lista crescente de agentes virais, bacteriológicos e fúngicos vêm sendo relatada (WALTZEK et al., 2012). Pesquisadores, reabilitadores, treinadores, veterinários, voluntários e caçadores de subsistência têm um risco aumentado de adquirirem doenças zoonóticas através da exposição ocupacional prolongada (WALTZEK et al., 2012).

Dentre as enfermidades infecciosas transmissíveis e com potencial zoonótico de maior relevância em populações de cetáceos marinhos, pode-se destacar a brucelose. A brucelose nos cetáceos é causada pela *Brucella ceti* e foi associada a problemas reprodutivos, quadros de meningoencefalite e infecções em tecidos linfóides (FOSTER et al., 2002).

Apesar da grande diversidade da fauna brasileira há pouco conhecimento sobre a ocorrência de enfermidades infecciosas circulantes em populações de animais silvestres, em especial em mamíferos aquáticos fluviais. O monitoramento da ocorrência de doenças infecciosas nestes animais pode levar à identificação de agentes patogênicos ainda não descritos e também à identificação de enfermidades cuja ocorrência esteja associada à contaminação de ecossistemas com patógenos de origem humana ou oriundos de animais domésticos. Informações desta natureza podem ser importantes na preservação da espécie, já que enfermidades infecciosas podem apresentar epidemiologia complexa e causar limitação do crescimento de determinadas populações animais por acarretar sinais clínicos severos, com elevadas taxas de mortalidade ou redução de fertilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CETÁCEOS FLUVIAIS BRASILEIROS

A ordem Cetacea é representada por mamíferos que são completamente adaptados à vida aquática, compreendendo 86 espécies (CULIK, 2010). Os cetáceos são divididos em duas subordens: Mysticeti e Odontoceti, que incluem golfinhos, toninhas e baleias. A distinção taxonômica destes dois grupos é baseada em diferenças morfológicas e fisiológicas, incluindo a presença ou ausência de dentes e o sistema de eco localização, que é exclusiva dos odontocetes (REEVES et al., 1992).

A sub-ordem Odontoceti, compreende nove famílias: Platanistidae, Pontoporiidae, Iniidae, Monodontidae, Phocoenidae, Delphinidae, Ziphiidae, Physeteridae e Kogiidae. Somente as famílias Monodontidae e Platanistidae não têm animais representantes na América do Sul.

Animais pertencentes à família Iniidae, são chamados de golfinhos de rio ou botos. O boto cor-de-rosa ou boto vermelho, como é conhecido pelos moradores da bacia amazônica, região onde este animal ocorre, pertence à espécie *Inia geoffrensis* (BLAINVILLE, 1817). Em outros países no qual ocorre, como a Colômbia, Equador e Peru este animal possui o nome de *bufeo colorado*. Este golfinho é pertencente à família Iniidae, sendo que estudos recentes reconhecem à existência de três subespécies para o gênero *Inia*: *Inia geoffrensis geoffrensis*, *I. g. boliviensis* e *I. g. humboldtiana* (BEST; DA SILVA, 1993; RICE, 1998).

Esta espécie animal vive em ambientes fluviais, não ocorrendo em ambientes marinhos. Dentre os golfinhos de rios, o boto vermelho é o maior deles sendo que os machos, podem atingir cerca de 2,55 metros de comprimento e um peso corporal de 200 kg, enquanto que para as fêmeas, os valores são de 2,25m de comprimento e peso corporal de 150 kg (KASTELEIN et al., 1999). Possuem o corpo muito flexível devido ao fato de viverem em ambientes fluviais, onde precisam ser ágeis para desviar de obstáculos e para capturar suas presas. As nadadeiras peitorais são grandes e

podem realizar movimentos para trás com facilidade o que os auxilia na movimentação em meio a raízes e troncos de árvores caídos nos ambientes onde vivem. Têm uma grande distribuição dentro da bacia amazônica, ocorrendo em cerca de seis países da América do Sul: Colômbia, Bolívia, Brasil, Venezuela, Peru e Equador. Sua área de ocupação é de cerca de sete milhões de km² (BEST, DA SILVA, 1989, 1993; CAMARGO, DA SILVA, 1998).

O boto vermelho possui hábitos sociais de formação de grupo, porém estes grupos são formados por poucos indivíduos. A maioria dos grupos é de dois animais, incluindo as fêmeas e seus filhotes. Quando em atividade de forrageio, estes animais possuem hábitos de se alimentar solitariamente, podendo às vezes ocorrer a formação de grupos maiores para maximizar a captura do alimento. Eles se alimentam de peixes, sendo que estudos referentes à sua ecologia alimentar mostraram podem se alimentar de cerca de 50 espécies de peixes, alguns com valores comerciais (BEST; DA SILVA, 1989).

Esta espécie de mamífero aquático sofre com as atividades antrópicas. Embora a caça de cetáceos livres seja atualmente proibida na maioria dos países sul-americanos, podem ser capturado acidentalmente em redes de pesca e também sofrer colisões com embarcações. Por conta de lendas Amazônicas o comércio de olhos, genitais, gordura e dentes de golfinhos de água doce podem ser verificados em algumas regiões, pois se acredita que essas partes sirvam como amuletos, encantos de amor ou tenham propriedades medicinais (BEST et al., 1989).

A espécie foi classificada como vulnerável na “Lista Vermelha da IUCN (IUCN *Red List of Threatened Species*)” até o ano de 1996. Porém, atualmente seu *status* é desconhecido em razão da deficiência de dados referentes ao tamanho da população, ecologia e principais riscos aos quais a espécie está submetida (REEVES et al., 2011).

Outra espécie de cetáceo fluvial observada na região é o boto tucuxi ou boto cinza, que pertence à família Delphinidae, espécie *Sotalia fluviatilis* (GERVAIS & DEVILLE, 1853), considerada a única espécie de delfínídeo de água doce sendo distribuída ao longo da bacia Amazônica. Ocorrem em grupos compostos geralmente por dois a seis animais. Os machos podem atingir 140 cm de comprimento e as fêmeas

entre 132 e 137 cm; apresentam peso corporal entre 35 e 45 kg. Alimentam-se de pelo menos 28 espécies de peixes, muitos deles com valor comercial (DA SILVA E BEST, 1994). Também é classificada como espécie com risco desconhecido na “Lista Vermelha da IUCN” em razão da ausência de dados referentes ao tamanho e distribuição populacional (SECCHI, 2010, 2012).

Há escassos dados disponíveis em literatura referentes ao aspecto sanitário destas populações de botos no Brasil. Santos et al. (2011) observaram elevada frequência de ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* numa população de *I. geoffrensis*, de vida livre, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil. Neste trabalho, foram avaliados 95 animais pelo teste de soroaglutinação modificada (SAM), sendo que 82 (86.3%) apresentaram títulos maiores ou iguais a 25.

Bonar e Wagner, em 2003, descreveram a ocorrência de uma síndrome dermatológica em botos da espécie *I. geoffrensis* caracterizada por lesões nodulares, de crescimento lento, presença e abscessos. As lesões foram associadas à infecção pela bactéria *Streptococcus iniae*, bactéria Gram positiva e com potencial zoonótico.

2.2 BRUCELOSE

A brucelose, doença infecciosa associada a infecções por bactérias do gênero *Brucella*, encontra-se disseminada em quase todas as áreas geográficas do mundo, podendo acometer seres humanos e diversas espécies animais, domésticas e silvestres (QUINN et al., 1994; ACHA; SZYFRES, 2001; BRICKER, 2002; NAVARRO et al., 2002).

Os membros desse gênero são bactérias Gram-negativas, em forma de cocobastonetes, desprovidas de cápsula, imóveis, não esporuladas, aeróbias ou microaerófilas e intracelulares facultativas (HIPÓLITO et al., 1965; ALTON et al., 1988; QUINN et al., 1994; AL DAHOUK et al., 2003). As espécies de *Brucella* são identificadas de acordo com o hospedeiro preferencial, com características morfológicas,

propriedades metabólicas, sorotipagem e fagotipagem (ALTON et al., 1988; ACHA; SZYFRES, 2001; BRICKER, 2002).

No gênero *Brucella* são reconhecidas seis espécies clássicas: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. canis* (ALTON et al., 1988; ACHA; SZYFRES, 2001; BRICKER, 2002; AL DAHOUK et al., 2003). Porém o número de espécies descritas neste gênero aumentou com as recentes descrições de *Brucella* em diversas espécies de hospedeiros, incluindo aquelas que acometem os mamíferos marinhos (FOSTER et al., 2002). As cepas de mamíferos marinhos diferem fenotípica e genotipicamente das cepas de *Brucella* que têm animais terrestres como hospedeiros, tendo sido denominadas *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*, tendo como hospedeiros de eleição os cetáceos e os pinípedes, respectivamente (FOSTER et al., 2007).

Além destas, outras duas novas espécies, denominadas *Brucella microti* e *Brucella inopinata*, também foram descritas. *B. microti* foi isolada do roedor silvestre da espécie *Microtus arvalis*, na República Tcheca (SCHOLZ et al., 2008) e de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) na Áustria (SCHOLZ et al., 2009). A *B. inopinata* foi isolada de implante mamário de uma mulher que apresentou sinais clínicos de brucelose (SCHOLZ et al., 2010). Recentemente, cepas de *Brucella* também foram isoladas de primatas não-humanos natimortos (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2009).

De forma geral, a transmissão de *Brucella* entre animais ocorre mais comumente pelo contato direto com fetos abortados e com secreções e excreções de animais infectados, frequentemente por ingestão, inalação, via venérea, inoculação conjuntival e infecção através de cortes na pele ou na mucosa (RADOSTIS et al., 2000; CORBEL, 2006). Microrganismos podem ser eliminados em produtos de abortamento, descargas vaginais, sêmen, urina, leite e outras secreções (QUINN et al., 1994; ACHA; SZYFRES, 2001). O agente penetra no organismo do hospedeiro pelas mucosas respiratórias, conjuntival, prepucial, vaginal ou orofaríngea, atingindo os linfonodos regionais e sendo posteriormente fagocitados pelos macrófagos ou outras células fagocitárias onde se replicam (CARMICHAEL; GREENE, 1990; DUNCAN, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; NIELSEN; QUINN et al., 1994). A *Brucella* não se multiplica fora do hospedeiro, porém pode persistir durante anos em fetos abortados e placentas

congelados, durante meses em condições úmidas em temperaturas de 10 a 15°C e horas a temperaturas entre 45 e 50°C.

Devido à sua predileção por células que produzem eritriol, a *Brucella* se replica intensamente no útero de ruminantes gestantes, induzindo o aborto no final da gestação e o nascimento prematuro de fetos (RADOSTITS et al., 2000; CORBEL, 2006).

Os sinais clínicos decorrentes da infecção por *Brucella* dependem tanto da espécie do patógeno como da espécie do hospedeiro acometido. Em animais, os sinais mais comumente observados são o abortamento no terço final da gestação, a repetição de cio em fêmeas sadias como também epididimite e orquite nos machos (CURRIER et al., 1982; CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992). O potencial zoonótico é conhecido para as espécies terrestres e as espécies com maior virulência para o homem são *B.melitensis*, *B.suis*, *B.abortus* e *B. canis*, nesta ordem. A infecção nos humanos pode acarretar uma variedade de sintomas não específicos. Durante a fase aguda da infecção são mais comumente observados febre intermitente, fadiga, sudorese noturna, calafrios, aumento do volume de linfonodos, mialgia e cefaléia. Nas infecções crônicas, os sintomas dependem da localização da infecção, podendo-se observar complicações osteoarticulares, endocardite, alterações neurológicas, abscessos em órgãos internos, hepatomegalia, esplenomegalia, complicações gastrointestinais, pulmonares, genito-urinárias, cutâneas e renais (CORBEL, 2006).

2.3 BRUCELOSE EM CETÁCEOS

O isolamento de *Brucella* em mamíferos aquáticos foi primeiramente descrito em 1994, de tecidos coletados durante a necropsia de focas (*Phoca vitulina*), toninhas (*Phocoena phocoena*) e golfinhos comuns (*Delphinus delphis*) na Escócia (EWALT et al., 1994; ROSS et al., 1994; PAYEUR et al., 1997). Análises bioquímicas e moleculares indicaram que as estirpes isoladas apresentavam características distintas das demais espécies de *Brucella* até então conhecidas, as quais foram denominadas *B. ceti* e *B.pinnipedialis* (FOSTER et al., 2007).

Estudos sobre a prevalência de brucelose em animais marinhos apresentaram resultados variáveis de acordo com a espécie, o teste diagnóstico empregado, a localização geográfica e a população amostrada (CFSPH, 2007). Entretanto, há fortes evidências sorológicas que sugerem que o agente tem ampla disseminação entre várias espécies de mamíferos aquáticos (NIELSEN; STEWART, 1996; NIELSEN, 2001, 2005; BOSSART, 2011).

De acordo com estudos sorológicos realizados em cetáceos, foram verificadas frequências de ocorrência de 33% em toninhas comuns (*Phocoena phocoena*) ao longo da costa da Escócia; de 31% em golfinhos comuns (*Delphinus delphis*) na costa Inglesa e Galesa; valores variando de 62 a 80% em golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) nas ilhas Solomon, conforme o teste diagnóstico usado; de 38% em baleias Minke (*Balaenoptera acutorostrata*) no norte do Pacífico; e valores de 78% em golfinhos cinzentos (*Lagenorhynchus obscurus*), de 50% em golfinhos comuns (*Delphinus delphis*), 60% em golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) e 25% em botos-de-burmeister (*Phocoena spinipinnis*) na costa Peruana (EWALT et al., 1994; JAHANS et al., 1997; JEPSON et al., 1997; TRYLAND et al., 1999; CULTER et al., 2005; FORBES et al., 2000; VAN BRESSEM et al., 2001; FOSTER et al., 2002; GODFROID, 2002; OHISHI et al., 2004; TACHIBANA et al., 2006). Nielsen et al. (2001) observaram uma frequência de ocorrência de 3,8% (94/2.470) ao testar várias espécies de mamíferos marinhos, incluindo cetáceos e pinípedes nos oceanos Atlântico, Pacífico e Ártico. Dentre os cetáceos, reações sorológicas positivas foram observadas em baleias Narval (*Monodon monocerus*) e belugas (*Delphinapterus leucas*), em prevalências de 6,5% (5/77) e 5,7% (28/488), respectivamente.

Um estudo realizado em animais encontrados encalhados nas costas das ilhas de Rhode e Connecticut mostraram 6% de positivos, num total de 119 animais, os quais foram positivos em três testes sorológicos realizados (teste do cartão, antígeno acidificado tamponado e rivanol); 48% foram positivos somente em um ou dois testes e foram classificados como suspeitos. A maioria dos animais suspeitos e de todos os soropositivos eram pinípedes, sendo que 14% (3/21) das focas comuns (*Phoca vitulina*) e 8% (4/53) de focas harpa (*Pagophilus groenlandicus*) foram soropositivas (MARATEA et al., 2003).

Apesar da alta soroprevalência relatada, a doença clínica não parece ser comum (BOSSART, 2011) e as taxas de mortalidade são desconhecidas. Quadros mais graves podem ocorrer em populações onde a infecção não é endêmica.

O isolamento de *Brucella* em amostras de tecidos foi relatado nas seguintes espécies de cetáceos marinhos: golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*), golfinho-comum (*Delphinus delphis*), golfinho-de-laterais-brancas-do-Atlântico (*Lagenorhynchus acutus*) e baleia-minke (*Balaenoptera acutorostrata*) na costa da Escócia e também da Noruega e ainda na toninha comum (*Phocoena phocoena*) na Alemanha e Reino Unido (CLAVAREAU et al., 1998; FOSTER et al., 2002; GONZALÉZ et al., 2002; PRENGER-BERNINGHOFF et al., 2008).

Nos cetáceos, a brucelose foi associada a quadros de meningoencefalite, presença de granulomas na glândula mamária em golfinhos-listrados (*Stenella coeruleoalba*) (FOSTER et al., 2002; GONZÁLEZ-BARRIENTO et al., 2010; ALBA et al., 2013), meningoencefalite e artrite em golfinhos comuns (*Delphinus delphis*) (DAVISON et al., 2013), abortamentos em golfinhos da espécie *Tursiops truncatus* (EWALT et al., 1994; MILLER et al., 1999), discoespondilite, necrose esplênica e orquite na toninha comum (*Phocoena phocoena*) (FOSTER et al., 2002; DAGLEISH et al., 2008). Em golfinhos da espécie *Lagenorhynchus acutus* foram observados necrose hepática, necrose esplênica, peritonite, abscessos cutâneos, mastite crônica, endometrite, abortamento, meningite (FOSTER et al., 2002) e em baleias Minke (*Balaenoptera acutorostrata*), quadros de orquite e a presença de nódulos uterinos, com lesões granulomatosas supurativas (OHISHI et al., 2003). A *B. ceti* também foi isolada em útero e glândula mamária de cetáceos e sem nenhuma patologia aparente (ROSS et al., 1996). Abscessos pulmonares também foram relatados em golfinhos nariz de garrafa (*Tursiops truncatus*) (CASSLE et al., 2013).

As bactérias do gênero *Brucella* não são móveis e parece não serem capazes de sobreviver durante períodos prolongados no ambiente marinho. Além, disso, a eliminação bacteriana em ambiente aquático pode acarretar a diluição da bactéria em níveis inferiores ao limiar de infecção. Estes fatores sugerem que a transmissão entre os cetáceos ocorra predominantemente pela via direta (GUZMÁN-VERRI et al., 2012).

Embora a transmissão de *Brucella* em mamíferos aquáticos ainda não seja bem entendida, evidências crescentes sugerem que os cetáceos podem contrair a infecção pelas vias vertical e horizontal (EWALT et al., 1994; CFSPH, 2007). Sugere-se que a transmissão horizontal possa ocorrer pela via genital, durante o acasalamento e pelo contato oronasal com fetos abortados e produtos do abortamento ou com lesões em animais infectados (HERNANDEZ-MORA et al., 2008; GUZMÁN-VERRI et al., 2012). A transmissão vertical, da mãe para o feto ou neonato também pode ocorrer (MILLER et al., 1999; HERNANDEZ-MORA et al., 2008; GONZÁLEZ-BARRIENTOS et al., 2010; GUZMÁN-VERRI et al., 2012).

A identificação de *Brucella* em tecidos de parasitos pulmonares da espécie *Parafilaroides inflexus*, que parasitavam toninhas, aventa a hipótese de que estes também possam atuar na transmissão da brucelose entre mamíferos aquáticos (DAWSON et al., 2008).

Brucelas isoladas de mamíferos aquáticos podem ser virulentas para mamíferos terrestres, porém a frequência de transmissão ainda é desconhecida. A predação de focas infectadas foi sugerida como uma possível fonte de infecção para ursos polares, com anticorpos anti-*Brucella*, mas sem alterações clínicas (CFSPH, 2007). Bovinos foram infectados experimentalmente por inoculação intravenosa e intraconjuntival com cepas de *Brucella* isoladas de focas do Pacífico (*Phoca vitulina richardsi*) apresentando Soroconversão e abortamento (RHYAN et al., 2001).

A população humana que está sob maior risco de adquirir brucelose a partir de mamíferos aquáticos inclui indivíduos em comunidades onde produtos originários de espécies marinhas são importantes partes da dieta, pessoas que lidam com mamíferos marinhos encalhados, tratadores, pesquisadores, veterinários, zoologistas e pescadores (NYMO et al., 2011).

Há dois relatos na literatura apontando o potencial zoonótico das cepas de *Brucella* que acometem mamíferos aquáticos. Na Inglaterra, um funcionário de laboratório contraiu e desenvolveu os sinais clínicos da doença enquanto manipulava culturas de *Brucella* isoladas de uma foca (BREW et al., 1999). Em 2003, o primeiro relato de caso de humanos infectados por cepas de animais marinhos foi publicado no Peru. Os autores deste trabalho descreveram o isolamento de cepas de *Brucella* de

mamíferos marinhos em dois pacientes com neurobrucelose e granulomas intracerebrais. A principal hipótese foi que a transmissão tenha ocorrido pelo consumo de frutos do mar crus (SOHN et al., 2003). Em 2006, McDonald et al. descreveu um quadro de osteomielite em paciente na Nova Zelândia em decorrência de infecção por cepas de *Brucella* de mamíferos aquáticos, sendo a infecção associada à ingestão de peixe cru.

Nos cetáceos, a brucelose pode ser diagnosticada pelo cultivo microbiológico em amostras biológicas provenientes de animais afetados, utilizando-se os mesmos meios de cultura que são empregados para o isolamento de brucelas de hospedeiros terrestres, como ágar Brucella, ágar Columbia, ágar Triptose e outros, acrescidos de 5% de soro fetal bovino e de mistura antibiótica, incubadas em atmosfera de microaerofilia. Embora o crescimento em meio de cultivo da maioria dos isolados de *Brucella* de cetáceos ocorra em torno de quatro dias de incubação, alguns podem demorar de 7 a 10 dias para crescerem. Por esse motivo muitos autores recomendam que culturas de animais marinhos sejam incubadas durante 14 dias antes de serem descartadas como negativas (GUZMAN-VERRI et al., 2012).

A identificação dos isolados pode ser realizada pelos métodos clássicos, baseados em características morfológicas, bioquímicas, metabólicas e fagotipagem (ALTON et al., 1988). A caracterização molecular utilizando marcadores que permitam a identificação de *B. ceti* e *B. pinnipedialis* também foi descritos. De acordo com Whatmore et al. (2008), a caracterização baseada em sequenciamento de múltiplos *loci* gênicos permitiu a identificação de cinco genótipos diferentes nas espécies de *Brucella* oriundas de mamíferos aquáticos, sendo que três deles (ST23, ST26 e ST27) predominaram em isolados de *B. ceti* e dois deles (ST24 e ST25) em isolados de *B. pinnipedialis*. Além do sequenciamento *multilocus*, a identificação de isolados de mamíferos marinhos pode ser realizada utilizando-se os seguintes marcadores moleculares: análise de restrição enzimática dos genes *omp2a*, *omp2b* e *omp25* e caracterização baseada na localização de sequências de inserção (IS711) (DAWSON et al., 2008).

Testes sorológicos também podem ser utilizados no diagnóstico da infecção. Apesar de não permitirem a identificação da espécie de *Brucella* responsável pelas infecções, são úteis nas atividades de vigilância epidemiológica. Testes sorológicos padronizados para uso em animais terrestres vêm sendo utilizados para diagnóstico sorológico da brucelose em mamíferos marinhos, como o teste de soroaglutinação rápida em placa (SAR) (OHISHI et al., 2003), soroaglutinação em tubos (SAT) (TACHIBANA et al., 2006) o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), ensaios imunoenzimáticos (JEPSON et al., 1997; NIELSEN et al., 2001; VAN BRESSEN et al., 2001; TACHIBANA et al., 2006; GUZMÁN-VERRI et al., 2012) e teste de polarização fluorescente (TPF) (NEIMANIS et al., 2008). Contudo, estes não foram validados para mamíferos aquáticos; limiares de detecção não foram estabelecidos, bem como valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica, de maneira que os resultados podem ser variáveis conforme a espécie de hospedeiro e a prevalência da infecção (CFSPH, 2007).

Recentemente foram desenvolvidos e padronizados testes de ELISA (ensaio imunoenzimático) indireto para diagnóstico da infecção em odontocetos (HERNANDEZ-MORA et al., 2009; MEEGAN et al., 2012) e um ensaio competitivo para uso em mamíferos aquáticos (MEEGAN et al., 2010).

Desde a década de 1980 a reação em cadeia pela polimerase (PCR) vem sendo empregada para a detecção de *Brucella* em diversas espécies de hospedeiros (CORTEZ et al., 2001; NAVARRO et al., 2002, KEID et al., 2009) sendo uma alternativa para o diagnóstico direto da infecção, permitindo que o mesmo seja realizado com rapidez e elevada sensibilidade. A PCR pode ser concluída em apenas dois dias, não prescinde da viabilidade do agente presente na amostra e é menos suscetível aos inconvenientes gerados pela contaminação da amostra durante a colheita (BRICKER, 2002). Porém, há poucos registros da utilização da PCR no diagnóstico de brucelose em mamíferos aquáticos. (OHISHI et al., 2004; OMATA et al., 2006; SIDOR et al., 2013).

A ocorrência de brucelose vem sendo amplamente estudada em mamíferos marinhos em várias localidades, contudo, não há relatos na literatura científica de

pesquisas abordando a ocorrência destas infecções em espécies fluviais de cetáceos na região Amazônica.

3 OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivo pesquisar a ocorrência de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM), Tefé, Amazonas, Amazônia Central, Brasil.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS E ÁREA DE ESTUDO

A pesquisa de infecção por *Brucella* spp. foi realizada em animais de ambos os sexos e várias idades, pertencentes à ordem Cetacea, família Iniidae, espécie *Inia geoffrensis*. Os animais utilizados neste estudo são de vida livre e os procedimentos de captura de animais e de colheita e transporte de amostras foram realizados conforme protocolo descrito por Silva e Martim (2000) e autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Foram realizadas duas expedições para captura, marcação dos animais e colheita de amostras nos períodos de novembro de 2010 a de fevereiro de 2011 (expedição 1) e em novembro de 2011 (expedição 2), pela equipe do Projeto Boto, sob a coordenação da Dra. Vera Maria Ferreira da Silva, pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

A primeira expedição foi realizada nas seguintes localidades: Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM) município de Tefé, estado do Amazonas, Brasil (coordenadas: 64°45' W, 03°35 S); na área de Ilha da Juíza, no município de São Gabriel da Cachoeira, estado do Amazonas (coordenadas: 00° 08.539' S; 067° 04.361'W); e em duas localizações diferentes no rio Uaupés (coordenadas: 00° 06.190' N; 067° 31.197' W e 00° 11.936' N; 068° 00.884'W). A segunda expedição foi realizada na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM) município de Tefé, estado do Amazonas, Brasil (coordenadas: 64°45' W, 03°35 S).

De cada animal capturado foram coletadas amostras de sangue, leite e suabes genital, anal, nasal, oral e de eventuais lesões cutâneas apresentadas pelos animais. Um total de 161 animais foi capturado nos dois períodos de colheita. Na primeira

expedição, 114 animais foram capturados e na segunda expedição, 47 animais foram capturados. Dezenove animais foram capturados nas duas expedições realizadas.

Amostras de suabes (genital, nasal, oral, anal, de lesões cutâneas e de leite) dos 161 animais foram coletadas utilizando-se suabes estéreis acondicionados em frasco contendo meio de transporte de Stuart (STUART, 1959), para a realização do cultivo microbiológico para o diagnóstico de *Brucella* spp. Amostras de suabes estéreis, acondicionados em tubo estéril seco também foram coletadas para a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para diagnóstico do agente. As amostras foram mantidas refrigeradas durante o transporte e depois foram mantidas congeladas a -20°C no laboratório até o processamento.

As amostras de leite foram coletadas e identificadas das fêmeas lactantes, em microtubos de 1,5 mL, mantidas refrigeradas para transporte e posteriormente congeladas a -20°C. Quando descongeladas para processamento, foram separadas em duas alíquotas, a serem utilizadas nos procedimentos de cultivo microbiológico e extração de DNA.

O número total de cada categoria de amostras coletadas dos animais nas duas expedições está representado na tabela 1.

Tabela 1 - Número e categoria de amostras coletadas – São Paulo - 2014

Tipo de amostra		1ª expedição Nº amostras	2ª expedição Nº amostras
Suabes em tubos secos	<i>Suabe anal</i>	33	22
	Suabe genital	29	14
	Suabe oral	49	24
	Suabe nasal	41	23
	Suabe lesão	02	02
	Suabe leite	03	06
Total de suabes secos		157	91
Suabes em meio de Stuart	<i>Suabe anal</i>	54	29
	Suabe genital	44	15
	Suabe oral	63	33
	Suabe nasal	66	32
	Suabe lesão	03	01
	Suabe leite	00	00
Total de suabes em meio		230	110
Leite		14	15
Sangue total		72	46
Soros		67	00
Total geral de amostras		540	262

Amostras coletadas de *Inia geoffrensis* em duas expedições, realizadas em novembro de 2010 a de fevereiro de 2011 (expedição 1) e em novembro de 2011 (expedição 2), para diagnóstico de infecções por *Brucella* spp.

4.2 AMOSTRAS PADRÃO

A cepa 544 de *B. abortus* biovar1 foi utilizada como controle positivo para as reações de PCR usadas para detecção de *Brucella* spp.

4.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE INFECÇÃO POR *BRUCELLA* SPP.

A detecção de anticorpos anti-*Brucella* lisa nos soros dos animais foi realizada empregando-se as provas de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado

(AAT), soroaglutinação lenta com e sem o emprego do 2-mercaptoetanol (SAL-2ME e SAL, respectivamente) e o teste de polarização fluorescente (TPF). A pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* rugosa foi realizada empregando-se a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (OIE, 2009).

Os testes de AAT, 2-ME e IDGA foram realizados no Centro de Pesquisa em Saúde e Bem-Estar Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) situado no campus de Pirassununga, SP. O teste de PF foi realizado no Laboratório de Brucelose do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, situado na cidade de São Paulo, SP.

A prova de soroaglutinação rápida em placa com o AAT foi realizada conforme protocolo descrito por Lage et al. (2006). O antígeno utilizado consiste de uma suspensão celular, inativada pelo calor, da estirpe 1119-3 de *B. abortus*, na concentração de 8,0% e pH 3,65, corada pelo corante Rosa Bengala. O antígeno foi produzido pelo Instituto Biológico de São Paulo.

A prova de SAL foi executada conforme os protocolos descritos por Lage et al. (2006). O antígeno consistiu de uma suspensão celular, na concentração de 4,5% e inativada pelo calor, da amostra 1119-3 de *Brucella abortus* e foi produzido pelo Instituto Biológico.

O antígeno utilizado no teste de PF consistiu do polissacarídeo O (OPS) extraído de células de *B. abortus* e conjugado com isotiocianato de fluoresceína. O teste foi realizado utilizando-se o *Brucella abortus Antibody Test Kit (Diachemix, EUA)*, conforme recomendações do laboratório produtor.

O antígeno empregado na prova de imunodifusão em gel de ágar (MYERS; VARELA-DIAZ, 1980) consistiu de proteínas e lipopolissacarídeos solúveis, extraídos da amostra Reo 198 de *Brucella ovis*, sendo produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar, Curitiba, Brasil). A prova foi realizada e interpretada de acordo com as recomendações do laboratório produtor.

4.4 CULTIVO MICROBIOLÓGICO PARA ISOLAMENTO DE *BRUCELLA* SPP.

As amostras de leite e de suabes nasal, oral, genital, anal e de lesões cutâneas colhidos em tubo contendo meio de Stuart foram submetidas ao cultivo microbiológico para isolamento de *Brucella* spp., utilizando-se placas de Petri contendo um meio de cultivo seletivo capaz de permitir o isolamento de cepas lisas e rugosas de *Brucella*.

O cultivo microbiológico de *Brucella* spp. foi realizado no Centro de Pesquisa em Sanidade e Bem-Estar Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) situado no campus de Pirassununga, SP.

O meio de cultivo utilizado foi o ágar Triptose (Difco®) acrescido de 5% de soro fetal bovino (Cultilab®), o suplemento VCN (vancomicina, 3 mg/L; sulfonato de metano colistina, 7,5 mg/L; nistatina 12.500 UI/L de meio; BDBiosciences®), a anfoterecina B (2,5 mg/L; Sigma®) e a nitrofurantoína (10 mg/L; Sigma®) (OIE, 2009).

Um volume de 100 µL de cada amostra de leite foi semeado diretamente em placa de Petri, contendo o meio já descrito, com o auxílio de alças bacteriológicas estéreis e descartáveis. As placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia a 37°C durante 10 dias (OIE, 2009).

As amostras de suabe coletadas em meio de transporte de Stuart foram semeadas em placa de Petri, contendo o mesmo meio. As placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia a 37°C durante 10 dias (OIE, 2009).

4.4.1 Identificação morfológica das colônias bacterianas isoladas

A identificação morfológica das colônias bacterianas isoladas foi feita após o período de incubação de 10 dias, as placas de Petri semeadas foram verificadas quanto

ao crescimento de colônias bacterianas, que foram identificadas. Para isso, foi levado em consideração a forma e o aspecto macroscópico das colônias bacterianas isoladas, bem como suas características morfológicas e tintoriais pela coloração de Gram e microscopia óptica e características bioquímicas (ALTON et al., 1976).

Foram consideradas características morfológicas compatíveis com *Brucella*: colônias com 1 a 2 mm de diâmetro, coloração mel, translúcidas e claras, na forma de coco-bastonetes pequenos e fracamente Gram negativos.

4.4.2 Identificação molecular das colônias isoladas

As colônias bacterianas que apresentaram características morfológicas compatíveis com *Brucella* spp. foram coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, ressuspensas em 500µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) e acondicionadas a -20°C para posterior extração e amplificação de ácidos nucleicos.

Nos procedimentos de amplificação de ácidos nucleicos para a caracterização de isolados de *Brucella*, foi utilizado como controle positivo das reações a cepa 544 de *B. abortus* biovar1. Além disso, foi incluída uma amostra controle negativo, constituída por água ultrapura, para cada duas amostras a serem testadas, as quais foram submetidas aos mesmos procedimentos de extração e amplificação de ácidos nucleicos das amostras a serem testadas.

4.4.3 Extração de ácidos nucleicos de colônias bacterianas

As colônias bacterianas que apresentaram características morfológicas compatíveis com *Brucella* spp. foram coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, suspensas em 500µL de tampão Tris-EDTA e estocadas a -20°C para extração e amplificação de ácidos nucleicos.

Posteriormente foram submetidas à extração do DNA genômico pelo método descrito por Ausubel et al. (1999), utilizando lise enzimática com proteinase K e purificação com solventes orgânicos, conforme o protocolo descrito abaixo:

Protocolo para extração de DNA de colônias bacterianas:

- Descongelar em temperatura ambiente a suspensão de bactérias acondicionadas à temperatura de -20°C;
- Homogeneizar e transferir um volume de 300 µL para um novo microtubo com capacidade de 1500 µL;
- Adicionar 200µL de tampão de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%; proteinase K, 20mg/mL)
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Incubar em termobloco (Thermomixer Comfort 5355 Eppendorf, Germany) à temperatura de 37°C, overnight, sob agitação realizada durante 15 segundos a 1400 rpm, a cada 15 minutos;
- Adicionar 250 µL de clorofórmio e 250 µL de fenol equilibrado tamponado pH 8,0;
- Agitar durante 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar a 12.000 x g a 4°C durante 5 minutos;
- Transferir 400 µL da fase aquosa para um novo microtubo com capacidade de 1500µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
- Adicionar 400 µL de propanol puro;

- Homogeneizar por inversão e acondicionar à temperatura de -20°C durante uma hora;
- Centrifugar a $12.000 \times g$ durante 30 minutos;
- Descartar o sobrenadante por inversão e adicionar $1000 \mu\text{L}$ de etanol 70%;
- Homogeneizar por inversão;
- Centrifugar a $12.000 \times g$ durante 30 minutos;
- Descartar o sobrenadante por inversão;
- Secar o sedimento em termobloco sem agitação à temperatura de 56°C durante 10 minutos;
- Adicionar $30 \mu\text{L}$ de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
- Incubar em termobloco sem agitação à temperatura de 56°C durante 30 minutos;
- Acondicionar à temperatura de -20°C até a realização da PCR.

4.4.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificação das colônias bacterianas

A identificação das colônias bacterianas isoladas foi realizada utilizando-se reações de amplificação de ácidos nucleicos com os *primers* descritos nos itens 4.5.1 a 4.5.3. Para todas as reações de amplificação foi utilizado o termociclador Veriti 96-Well ThermalCycler (AB AppliedBiosystems, Califórnia-USA).

4.5 Primers utilizados na identificação molecular

Para caracterização e identificação molecular das colônias bacterianas foi utilizado um conjunto de *primers*. Juntamente com gene codificador do RNA ribossomal, foi utilizado o gene do 16S para identificação bacteriana e o gene codificador da recombinase (*recA*), que também pode fornecer informação sobre a posição taxonômica das bactérias (PAYENE et al., 2005), em especial na diferenciação entre microrganismos dos gêneros *Brucella* e *Ochrobactrum* que podem apresentar elevada similaridade genotípica no gene codificador da unidade 16S do RNA ribossomal.

4.5.1 Primers direcionados à região interespaçadora do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella* spp. (PCR-ITS)

Inicialmente, o DNA extraído das colônias bacterianas foi submetido à PCR utilizando-se os *primers* ITS66 e ITS279, os quais são para qualquer componente do gênero e direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella* spp. e amplificam um fragmento de 214pb (KEID et al., 2007).

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50µL, contendo: 200 µM de cada nucleotídeo (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), tampão de reação 10X (500mM KCl; 200mM Tris-HCl, pH 8.4), 0,5 µM de cada primer, 1,5mM de MgCl₂; 1,5 Unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e água ultrapura (KEID et al., 2007).

A PCR-ITS foi realizada nas seguintes condições de amplificação: aquecimento inicial a 95°C durante dois minutos, 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos, seguidos de aquecimento final a 72°C durante 10 minutos. A sequência dos *primers* ITS66 e ITS279 está representada na tabela 2.

Tabela 2 - Sequência dos *primers* empregados direcionados à região interespçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella* spp. - São Paulo – 2014

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
ITS66	5'ACA TAG ATC GCA GGC CAG TCA 3'
ITS279	5'AGA TAC CGA CGC AAA CGC TAC 3'

Sequência dos *primers* empregados para a detecção em colônias bacterianas isoladas e direcionados à região interespçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella* spp.

4.5.2 *Primers* direcionados ao gene *recA* (PCR-BruOchro)

Um gene que pode fornecer informação sobre a posição taxonômica das bactérias é o gene codificador da recombinase A (*recA*) (PAYENE et al., 2005), sendo útil na diferenciação entre microrganismos dos gêneros *Brucella* e *Ochrobactrum*. Portanto, as amostras que apresentaram resultados positivos na reação de amplificação com os *primers* ITS66 e ITS279 foram caracterizadas quanto ao gene *recA*.

Foram utilizados os *primers* BruOchro-F e BruOchro-R, descritos por Scholz et al. (2006), que amplificam um fragmento de 1065pb de todos os componentes do gênero *Brucella* e parte dos componentes do gênero *Ochrobactrum*. A sequência dos *primers* pode ser visualizada na tabela 3.

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50µL, contendo: 200 µM de cada nucleotídeo (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), tampão de reação 10X (500mM KCl; 200mM Tris-HCl, pH 8.4), 0,5 µM de cada primer, 1,5mM de MgCl₂; 1,5 Unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e água ultrapura. A PCR foi realizada nas seguintes condições de amplificação: aquecimento inicial a 95°C durante dois minutos, 40 ciclos de 95°C durante 60 segundos, 62°C durante 60 segundos e 72°C durante 60 segundos, seguidos de aquecimento final a 72°C durante 10 minutos.

Tabela 3 - *Primers* bacterianos universais para a identificação de isolados, direcionados ao gene 16S - São Paulo - 2014

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
BruOchro-F	5' ATGTCTCAAATTCATTGCGAC 3'
BruOchro-R	5' AGCATCTTCTTCCGGTCCGC 3'

Seqüência dos *primers* bacterianos universais empregados para a identificação de isolados bacterianos, direcionados ao gene codificador da unidade 16S do RNA ribossomal de eubactérias.

4.5.3 *Primers* direcionados ao gene *recA* (PCR-*recA*)

Em razão dos *primers* BruOchroF e BruOchroR, não permitirem a amplificação de algumas espécies do gênero *Ochrobactrum*, como *O. grignonense*, *O. gallinifaecis* e outros (SCHOLZ et al., 2006), *primers* foram desenhados para possibilitar a amplificação do gene *recA* de qualquer componente dos gêneros *Brucella* e *Ochrobactrum*.

Para o desenho dos *primers*, seqüências de nucleotídeos do gene *recA* das estirpes 16M de *Brucella melitensis* biovar 1 (GI17986242) e de *Ochrobactrum anthropi*, cepa ATCC 49188 (GI15155 9234) foram obtidas no sítio Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e em seguida utilizadas na busca de seqüências similares utilizando o programa BLAST-Basic Local Alignment Search Tool (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Foram recuperadas 225 seqüências do gene *recA*, sendo 18 seqüências representando as seguintes espécies de *Brucella*: *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. microti*, *B. pinnipedialis* e *B. ceti*; e 207 seqüências representando as seguintes espécies de *Ochrobactrum*: *O. anthropi*, *O. intermedium*, *O. pecoris*, *O. lupini*, *O. tritici*, *O. cytisi*, *O. grignonense*, *O. pseudogrignonense*, além de algumas estirpes de *Ochrobactrum* cujas espécies não foram identificadas.

As 225 sequências de nucleotídeos recuperadas foram alinhadas, utilizando-se o programa Codon Code Aligner, versão 4.0.4. A partir deste alinhamento, procuraram-se regiões que tivessem similaridade máxima entre as sequências das diversas espécies de *Brucella* e *Ochrobactrum* pesquisadas. Cinco *primers* (dois *primers* senso e três *primers* anti-senso) foram desenhados com o auxílio do programa Oligo (RYCHILIK; ROADS, 1989) de forma a permitir a amplificação de um fragmento de 495 pb do gene *recA* de qualquer componente dos gêneros *Brucella* e *Ochrobactrum*. Os *primers* desenhados foram avaliados utilizando-se o programa primer-BLAST de forma a garantir que não apresentem similaridade capaz de garantir a amplificação do gene *recA* de outros organismos que não aqueles pertencentes aos gêneros *Brucella* e *Ochrobactrum*. As sequências dos *primers* desenhados podem ser observadas na tabela 4.

Tabela 4 - Sequência dos *primers* empregados para a identificação de isolados bacterianos, direcionados ao gene *recA* - São Paulo – 2014

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
recA[1]474F20	5' GCRTTCGTCGAYGCGGAACA 3'
recA[2]474F20	5' GCATTYGTGATGCGGAACA 3'
recA[1]968R25	5' CATGATGTCRAATTCGACYTGCTTG 3'
recA[2]968R25	5' CATGATRTCGAACTCSACCTGCTTG 3'
recA[3]968R25	5' CATGATATCGAATTCRACYTGCTTG 3'

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50µL, contendo: 200 µM de cada nucleotídeo (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), tampão de reação 10X (500mMKCl; 200mM Tris-HCl, pH 8.4), 1,5 µM de cada primer, 1,5mM de MgCl₂; 1,5 Unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e água ultrapura. A PCR foi realizada nas seguintes condições de amplificação: aquecimento inicial a 95°C durante dois minutos, 40 ciclos de 95°C durante 60

segundos, 62°C durante 60 segundos e 72°C durante 60 segundos, seguidos de aquecimento final a 72°C durante 10 minutos.

4.5.4 Visualização dos produtos amplificados

A análise dos produtos amplificados foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8,0). O gel foi submetido a voltagem constante de 6-7 V/cm.

O gel foi imerso em uma solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL durante 20 minutos e posteriormente observado em um transiluminador ultravioleta, que possibilitou a visualização das bandas amplificadas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), que foram comparadas com um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases.

4.5.5 Purificação dos produtos amplificados

Os produtos amplificados pelas reações PCR-OchroBru e PCR-recA foram cortados do gel de agarose com auxílio de estilete. Os fragmentos contendo as bandas foram retirados e acondicionados em microtubos para posterior purificação. A purificação foi feita com os *kits* Illustra GFX PCR DNA e GEL Band Purification Kit (GE Healthcare).

4.6 SEQUENCIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Os produtos de PCR purificados conforme descrito no item anterior, foram sequenciados exatamente como descrito pelo fabricante do *kit* *Abi Prism Big Dye TM Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, CA, USA). O protocolo utilizado na reação de sequenciamento, para cada amostra, está descrito na tabela 5.

Tabela 5 - Mistura de reagentes para a reação de sequenciamento automático de ácidos nucleicos - São Paulo – 2014

Reagente	Amostras de DNA e Intensidade das bandas*		
	Fracas	Médias	Fortes
Premix Ready Reaction (Big Dye)	4µl	4µl	4µl
Tampão de sequenciamento (5X conc)	2µl	2µl	2µl
Amostra de DNA	13µl	6µl	4µl
Primer (10pmol/µl)	1µl	1µl	1µl
Água Ultra Pura	-	7µl	9µl
Volume Total	20µl	20µl	20µl

* De acordo com a intensidade dos produtos de PCR, menor ou maior quantidade de amostras foram empregadas na reação de sequenciamento, de forma que bandas muito fracas precisavam ser sequenciadas com um maior volume de amostra e vice-versa.

Foi utilizado o seguinte ciclo para a reação de sequenciamento:

- Desnaturação inicial a 96°C por um minuto;
- Desnaturação a 96°C por 10 segundos;
- *Annealing* a 50°C por 5 segundos, 25 vezes;
- Extensão a 60°C por 4 minutos;
- Final 4°C indefinidamente.

Os mesmos *primers* empregados nas reações de PCR, descritos nos itens 4.5.1 e 4.5.2 foram utilizados nas reações de sequenciamento.

4.6.1 Purificação de DNA pós-sequenciamento

Após a realização da reação de sequenciamento, as amostras de DNA foram purificadas para posterior resolução utilizando-se o sequenciador automático Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. A purificação foi feita de acordo com o protocolo descrito abaixo:

Protocolo de purificação de DNA pós-reação de sequenciamento

- Adicionar 120µl de etanol 100%;
- Adicionar 10µl de EDTA 125mM;
- Deixar as amostras por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente;
- Centrifugar a 16.000 x g por 45 minutos;
- Aspirar o sobrenadante;
- Adicionar 65µl de etanol 70%;
- Centrifugar a 16.000 x g por 15 minutos;
- Aspirar o sobrenadante;
- Secar as amostras a 95°C em banho seco;
- Estocar a -20°C.

4.6.2 Análise das sequências obtidas

As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o programa Codon Code Aligner para obtenção da sequência consenso, as quais foram alinhadas com sequências homólogas obtidas no programa BLAST (blastn, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Uma vez selecionadas as sequências homólogas, foi realizada reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbour-joining e teste de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Foi incluído apenas um representante de cada alelo na análise. A árvore foi gerada utilizando-se o programa MEGA. As propostas filogenéticas foram baseadas nas sequências de nucleotídeos de um fragmento de 495 pb do gene *recA*, bem como nas sequências de aminoácidos da proteína RECA.

4.7 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

As colônias bacterianas que apresentaram resultado positivo na PCR-ITS foram submetidas à caracterização bioquímica, utilizando-se o sistema API20 (Biomerieux), conforme as instruções do fabricante.

4.8 DETECÇÃO DIRETA DE *BRUCELLA* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Além de ser utilizada para a identificação das colônias bacterianas isoladas, a PCR foi empregada também para o diagnóstico direto das infecções por *Brucella* spp. nas amostras biológicas obtidas dos botos.

Nos procedimentos de extração e amplificação de ácidos nucléicos para a detecção de *Brucella* spp. nas amostras clínicas, foram empregados os controles positivos descritos no item 4.2.

Além disso, foi incluída uma amostra controle negativo, constituída por água ultrapura, para cada três amostras de botos a serem testadas, as quais foram submetidas aos mesmos procedimentos de extração e amplificação de ácidos nucléicos das amostras a serem testadas.

4.8.1 Extração de DNA das amostras biológicas de botos

As amostras de sangue e leite foram descongeladas e um volume de 500 µL e 200 µL, respectivamente, foi submetido ao procedimento de extração de DNA para posterior reação de PCR para detecção de *Brucella* spp. A extração de DNA das amostras de leite foi realizada conforme descrito por Longo et al. (2009) com algumas modificações. As amostras de suabes coletadas em tubos secos foram ressuspensas em um mililitro de água ultrapura, homogeneizadas em vórtex, sendo separado um volume de 200 µL para o procedimento de extração de DNA. A extração de DNA das amostras de sangue e suabe foi realizada de acordo com os protocolos descrito por Keid et al. (2007), com algumas modificações. Os protocolos de extração utilizados para as amostras de sangue, leite e suabes encontram-se descritos abaixo.

Protocolo de extração de DNA de amostras de sangue:

- Descongelar em temperatura ambiente a amostra de sangue acondicionadas à temperatura de -20°C;
- Homogeneizar e transferir um volume de 500 µL para um microtubo com capacidade de 1500 µL;
- Adicionar 200 µL de tampão TE e 50 µL de lisozima (concentração);

- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Incubar a 37° C durante 2 horas;
- Adicionar 200 µL de tampão de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%; proteinase K, 20mg/mL)
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Incubar em termobloco (Thermomixer Comfort 5355 Eppendorf, Germany) à temperatura de 37°C, overnight, sob agitação realizada durante 15 segundos a 1400 rpm, a cada 15 minutos;
- Acrescentar 70 µl de NaCl (5 M) e 65 µl de brometo de cetiltrimetilamônio, brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTab);
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Incubar em termobloco a 65°C durante 10 minutos;
- Acrescentar 635 µl de clorofórmio;
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 10 minutos a 22°C;
- Recuperar o sobrenadante com a pipeta, aproximadamente 400 µl e passar para novo tubo;
- Acrescentar 200 µl de fenol e 200 µl de clorofórmio;
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 5 minutos;
- Recuperar o sobrenadante com a pipeta, aproximadamente 300 µl e passar para novo tubo;
- Acrescentar 300 µl de clorofórmio;
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 5 minutos;
- Recuperar o sobrenadante com a pipeta, aproximadamente 200 µl e passar para novo tubo;
- Acrescentar 200 µl de propanol;
- Incubar a -20°C por pelo menos uma hora;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C;
- Desprezar sobrenadante por inversão;

- Acrescentar 1 mL de etanol 70%;
- Homogeneizar por inversão;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 20 minutos a 4°C;
- Desprezar sobrenadante por inversão;
- Secar o sedimento em termobloco sem agitação à temperatura de 56°C durante 10 minutos;
- Adicionar 30µL de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
- Incubar em termobloco sem agitação à temperatura de 56°C durante 30 minutos.

Protocolo de extração de DNA de amostras de suabes:

- Descongelar em temperatura ambiente a suspensão de bactérias acondicionadas à temperatura de -20°C;
- Homogeneizar e transferir um volume de 200 µL para um novo microtubo com capacidade de 1500 µL;
- Adicionar 200 µL de tampão TE e 50 µL de lisozima (concentração);
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Incubar a 37º C durante 2 horas;
- Adicionar 200µL de tampão de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%; proteinase K, 20mg/mL);
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Incubar em termobloco (Thermomixer Comfort 5355 Eppendorf, Germany) à temperatura de 37 oC, overnight, sob agitação realizada durante 15 segundos a 1400 rpm, a cada 15 minutos;
- Adicionar 250 µL de clorofórmio e 250 µL de fenol equilibrado saturado pH 8,0;
- Agitar durante 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar a 12.000 x g a 4°C durante 5 minutos;
- Transferir 400 µL da fase aquosa para um novo microtubo com capacidade de 1500µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
- Adicionar igual volume de propanol puro;

- Homogeneizar por inversão e acondicionar à temperatura de -20°C durante uma hora;
- Centrifugar a $12.000 \times g$ durante 30 minutos;
- Descartar o sobrenadante por inversão e adicionar $500 \mu\text{L}$ de etanol 70%;
- Homogeneizar por inversão;
- Centrifugar a $12.000 \times g$ durante 20 minutos;
- Descartar o sobrenadante por inversão;
- Secar o sedimento em termobloco sem agitação à temperatura de 56°C durante 10 minutos;
- Adicionar $30 \mu\text{L}$ de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
- Incubar em termobloco sem agitação à temperatura de 56°C durante 30 minutos.

Protocolo de extração de DNA das amostras de leite:

- Descongelar em temperatura ambiente as amostras de leite acondicionadas à temperatura de -20°C ;
- Homogeneizar e transferir um volume de $200 \mu\text{L}$ para um novo microtubo com capacidade de $1500 \mu\text{L}$;
- Acrescentar $200 \mu\text{L}$ de TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) e $50 \mu\text{L}$ de lisozima;
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Incubar em termobloco por 2 horas, 37°C sob agitação;
- Spin nas amostras;
- Acrescentar tampão lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%; proteinase K, 20mg/mL, Triton™ X- 100 solução 10% em 10mL, NaCl 5 M);
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Incubar em termobloco (Thermomixer Comfort 5355 Eppendorf, Germany) à temperatura de 37°C , overnight, sob agitação realizada durante 15 segundos a 1400 rpm, a cada 15 minutos;
- Spin nas amostras;
- Acrescentar $300 \mu\text{L}$ de clorofórmio e $300 \mu\text{L}$ de fenol;

- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 5 minutos;
- Recuperar sobrenadante com pipeta, aproximadamente 400 µl para tubo novo;
- Acrescentar 400 µl de propanol;
- Incubar a -20°C por pelo menos uma hora;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C;
- Desprezar sobrenadante por inversão;
- Acrescentar 1 mL de etanol 70%;
- Homogeneizar por inversão;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 20 minutos a 4°C;
- Desprezar sobrenadante por inversão;
- Secar o sedimento em termobloco sem agitação à temperatura de 56°C durante 10 minutos;
- Adicionar 30µL de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
- Incubar em termobloco sem agitação à temperatura de 56°C durante 30 minutos.

4.8.2 Reação de amplificação de ácidos nucléicos extraídos (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras biológicas de botos

A PCR para detecção direta de *Brucella* spp. foi realizada nas amostras de DNA extraídas de sangue, leite e suabes (nasal, oral, anal, genital, de lesões cutâneas). Os protocolos de amplificação e revelação dos produtos amplificados foram os mesmos descritos no item 4.5.1, utilizando-se a PCR-ITS.

4.8.3 Caracterização dos produtos amplificados em amostras biológicas de botos

As amostras que apresentaram resultados positivos na reação realizada na PCR-ITS foram submetidas à PCR-recA (conforme item 4.5.3), para o posterior sequenciamento de ácidos nucleicos a fim de identificar os organismos detectados. Na tentativa de aumentar a intensidade do produto amplificado para viabilizar a reação de sequenciamento, foram realizadas reações no formato *single tube nested-PCR*, utilizando-se o mesmo par de *primers* da primeira amplificação.

4.8.4 Análise das sequências obtidas

As sequências obtidas foram analisadas conforme descrito no item 4.6.2.

5 RESULTADOS

5.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE INFECÇÃO POR *BRUCELLA* SPP.

As 67 amostras de soros colhidas durante a primeira expedição, apresentaram resultados negativos nos testes de AAT, PF e IDGA.

5.2 CULTIVO MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Das 369 amostras submetidas ao cultivo microbiológico, duas amostras de suabe apresentaram características compatíveis com o gênero *Brucella* na identificação morfológica e também resultados positivos pela PCR-ITS, sendo uma amostra de suabe oral obtida do animal 812 e uma amostra de suabe anal obtida do animal 417.

O animal 812 é um macho, pertencente à espécie *Sotalia fluviatilis*, capturado durante a segunda expedição, enquanto que o animal 417 é uma fêmea da espécie *Inia geoffrensis*, a qual foi capturada nas duas expedições, sendo que o resultado positivo na PCR-ITS foi obtido de uma amostra coletada durante a segunda expedição.

A caracterização bioquímica da amostra 417 pelo sistema API20 indicou tratar-se de uma bactéria pertencente ao gênero *Ochrobactrum*. Não foi possível a caracterização bioquímica da amostra 812, por não ter sido possível obtê-la em cultura pura.

As amostras foram submetidas à PCR-BruOchro e PCR-recA sendo que a amostra 417 apresentou produto amplificado do tamanho esperado na PCR-recA (495 pb), mas resultado negativo na PCR-BruOchro. A amostra de suabe oral do animal 812 não foi amplificada com sucesso em nenhuma das duas reações.

O produto amplificado na PCR-recA da amostra obtida do animal 417 foi sequenciado para a identificação da amostra, utilizando-se os mesmos *primers* usados nas reações de PCR.

5.3 DETECÇÃO DE *BRUCELLA* SPP. EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE BOTOS

Das 118 amostras de sangue total analisadas pela PCR-ITS, uma das 72 (1,38%) coletadas durante a 1ª expedição de coleta e cinco das 46 (10,86%) coletadas durante a 2ª expedição de coleta, apresentaram resultados positivos (Figura 1).

Figura 1 - Amostras de DNA extraídas de sangue de botos da espécie *Inia geoffrensis*, amplificadas pelos primers ITS66 e ITS279, direcionados à região interespacedora do RNA ribossomal de *Brucella* spp, gerando um produto amplificado de 214 pb

Fonte: Departamento de VPS/FMVZ/USP. Foto: (ROCCA, M.P., 2013)

Legenda:

- 1- Padrão de peso molecular de 100 pb
- 2- Amostra de sangue de *I. geoffrensis* (animal 366) com resultado **positivo**
- 3- Amostra de sangue de *I. geoffrensis* (animal 417) com resultado **positivo**
- 4- Amostra de sangue de *I. geoffrensis* (animal 330) com resultado negativo
- 5- Amostra de sangue de *I. geoffrensis* (animal 432) com resultado **positivo**
- 6- Amostra de sangue de *I. geoffrensis* (animal 171) com resultado negativo
- 7- Amostra de sangue de *I. geoffrensis* (animal 273) com resultado negativo
- 8- Amostra de sangue de *I. geoffrensis* (animal 47) com resultado negativo
- 9- Amostra de sangue de *I. geoffrensis* (animal 38) com resultado negativo

- 10- Controle negativo 1 (água ultrapura)
- 11- Controle positivo (DNA de *Brucella abortus* biovar 1, cepa 544)
- 12- Controle negativo 2 (água ultrapura)
- 13- Controle negativo 3 (água ultrapura)
- 14- Controle negativo 4 (água ultrapura)

Das 248 amostras de suabes analisadas pela PCR-ITS, uma das 157 (0,63%) coletadas durante a 1ª expedição apresentou resultado positivo. Nenhuma das 91 amostras coletadas durante a segunda expedição apresentou resultado positivo.

Das 29 amostras de leite analisadas pela PCR-ITS, duas das 14 (14,28%) coletadas durante a 1ª expedição e três das 15 (20%) coletadas durante a 2ª expedição de coleta, apresentaram resultados positivos.

Dos animais que apresentaram resultados positivos na PCR-ITS, três foram negativos pelos testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Brucella* lisa e rugosa. Os demais animais que apresentaram resultados positivos pela PCR não tiveram amostras de soros analisadas.

Considerando os 128 animais amostrados, 11 (8,59%) apresentaram resultado positivo pela PCR-ITS em pelo menos uma amostra testada, sendo o número de animais positivos para cada tipo de amostra o seguinte: cinco positivos em amostras de sangue, um positivo em amostra de sangue e leite, quatro positivos apenas em amostras de leite e um positivo em amostra de suabe oral.

O animal de número 417, que apresentou isolamento de *Ochrobactrum* em amostra de suabe anal também apresentou resultado positivo pela PCR-ITS na amostra de sangue total.

Todas as amostras biológicas que apresentaram resultados positivos pela PCR-ITS foram submetidas à PCR-recA sendo que destas, apenas duas amostras [identificadas como 183 (L1) e 432 (L2)] apresentaram o produto amplificado no tamanho esperado, de 495 pb na PCR-recA.

Os produtos amplificados foram sequenciados para sua posterior identificação, utilizando-se os mesmos *primers* usados na reações PCR-recA.

5.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

A proposta filogenética para as amostras de suabe anal do animal 417, foi baseada nas sequências de nucleotídeos de um fragmento de 495 pb do gene *recA* e pode ser visualizada na figura 2. De acordo com a análise, foram formados cinco clados separados entre si por elevado suporte estatístico. A amostra de *Ochrobactrum* obtida do animal 417 mostrou-se filogeneticamente bem relacionada a representantes da espécie *O. intermedium*, o que provavelmente classifica o isolado obtido como pertencente a esta espécie. Dentro deste agrupamento filogenético observaram-se três amostras representantes de *O. anthropi*.

Figura 2 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbour-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Utilização de 495 nucleotídeos do gene codificador da recombinase (*recA*). Foi incluído apenas um representante de cada alelo de *Ochrobactrum* e *Brucella*.

Fonte: Árvore gerada com o programa MEGA em 2014.

As propostas filogenéticas para as amostras de leite dos animais 183 (L1) e 432 (L2) e, foram realizadas com base nas sequências de aminoácidos da proteína RECA.

A amostra amplificada a partir de leite do animal 432 (amostra L2) formou um clado juntamente com as bactérias *Propionicimonas paludicola*, *Micropruina glycogenica* e *Naumannella halotolerans* e *Propionibacterium propionicum*, com suporte estatístico elevado. (Figura 3).

Figura 3 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbour-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Utilização de sequência de aminoácidos da proteína recombinase (RECA). Foi incluído apenas um representante de cada alelo de *Ochrobactrum* e *Brucella*.

Fonte: Árvore gerada com o programa MEGA em 2014.

A análise filogenética da amostra amplificada a partir de leite do animal 183 (amostra L1) indicou que a mesma formou agrupamento com os microrganismos *Cellulomonas fimi*, *C. flavigena* e *Cellvibrio gilvus*, porém, com baixo suporte estatístico (Figura 4), portanto não possibilitando a identificação da espécie do microrganismo detectado.

Figura 4 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbour-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Utilização de sequência de aminoácidos da enzima recombinase (RECA). Foi incluído apenas um representante de cada alelo de *Ochrobactrum* e *Brucella*.

Fonte: Árvore gerada com o programa MEGA em 2014.

6 DISCUSSÃO

No projeto proposto não foram verificadas evidências sorológicas de infecção por *Brucella* spp. na população analisada.

A presença de anticorpos anti-*Brucella* sugere a exposição à *Brucella* spp., mas não indica qual a espécie de *Brucella* que induziu a produção desses anticorpos. Os testes sorológicos utilizados para o diagnóstico da brucelose possibilitam apenas a diferenciação entre espécies lisas e rugosas de *Brucella*, mas não a identificação da espécie. Ambas as espécies de *Brucella* que possuem mamíferos aquáticos como hospedeiros (*B. ceti* e *B. pinnipedialis*) são classificadas antigenicamente como lisas.

A frequência de ocorrência de brucelose, determinada sorologicamente, em cetáceos marinhos, em estudos realizados previamente variou de 3,8% a 80%, conforme a espécie animal, a localização geográfica e o teste sorológico utilizado para a detecção de anticorpos séricos (EWALT et al., 1994; JAHANS et al., 1997; JEPSON et al., 1997; TRYLAND et al., 1999; FORBES et al., 2000; NIELSEN et al., 2001; VAN BRESSEM et al., 2001; FOSTER et al., 2002; GODFROID, 2002; OHISHI et al., 2004; CULTER et al., 2005; TACHIBANA et al., 2006). Nestes animais, as infecções por *Brucella* descritas foram associadas à *B. ceti* (FOSTER et al., 2007; DAGLEISH et al., 2008; DAWSON et al., 2008), contudo, animais aquáticos também podem ser expostos à infecções por estirpes de *Brucella* que possuem animais terrestres como reservatórios, como bovinos, suínos, ovinos e caprinos (GODFROID, 2002). Foi relatado o isolamento de *B. melitensis*, espécie que tem como principal hospedeiro os caprinos domésticos, de amostras de baço, fígado, rins e de lesões cutâneas em peixes da espécie (*Clarias gariepinus*), na região do delta do rio Nilo, Egito. Além das lesões cutâneas, os animais apresentaram congestão em baço e fígado. A brucelose causada por *B. melitensis* é considerada endêmica em ruminantes da região, onde a disposição de dejetos e carcaças de ruminantes em canais do rio Nilo constitui prática comum (EL-TRAS et al., 2010). É possível que a contaminação da água com *Brucella* oriunda de criações de ruminantes tenha provocado a infecção nos peixes, os quais podem atuar como reservatório da infecção. Estes dados sugerem que a criação de animais domésticos

próximos a rios e outros mananciais poderia causar a contaminação de águas e aumentar do risco de transmissão de doenças para espécies de animais silvestres, incluindo mamíferos aquáticos.

As investigações sorológicas de brucelose em cetáceos marinhos, vêm sendo baseadas em testes sorológicos utilizados para diagnóstico da brucelose em animais terrestres, incluindo o teste de aglutinação em placa (OHISHI et al., 2003), teste do antígeno acidificado tamponado (AA), teste de soroaglutinação em tubos (MILLER et al., 1999; TACHIBANA et al., 2006), teste de fixação de complemento, teste de imunodifusão em gel de ágar, teste do rivanol (MILLER et al., 1999), ensaios imunoenzimáticos competitivos (MILLER et al., 1999; NIELSEN et al., 2001; NEIMANIS et al., 2008), ensaios imunoenzimáticos indiretos (HERNANDEZ-MORA et al., 2009; MEEGAN et al., 2010) e teste de polarização fluorescente (NEIMANIS et al., 2008).

Os testes de AAT e TPF foram selecionados para uso no presente projeto, em razão de apresentarem sensibilidade elevada para o diagnóstico da brucelose nos bovinos, serem testes de simples realização e não prescindirem de conjugados espécie-específicos, o que seria uma limitação para o diagnóstico da brucelose em espécies silvestres de hospedeiros, em especial aquelas avaliadas no presente trabalho.

O teste de polarização fluorescente (TPF) emprega como antígeno a cadeia O do lipopolissacarídeo da cepa 1119-3 de *B. abortus*, conjugada ao isotiocianato de fluoresceína, permitindo, portanto seu emprego para o diagnóstico da brucelose em qualquer espécie animal (NIELSEN et al., 1998). O teste vem sendo empregado em programas de controle da brucelose bovina na América do Norte, Europa e Brasil, sendo considerado um teste de elevada sensibilidade e especificidade (MCGIVEN et al., 2003; GRAINER et al., 2009).

Para mamíferos aquáticos, o desempenho do TPF em termos de sensibilidade e especificidade ainda não foi bem estabelecido. Na literatura científica, ainda não houve definição e validação de um ponto de corte específico para cetáceos. Em 2008, Neimanis et al. utilizaram a polarização fluorescente como teste confirmatório para o

diagnóstico de brucelose em 196 toninhas (*Phocoena phocoena*) no Canadá. Animais que apresentaram resultado positivo no teste de ELISA competitivo (ELISAc) foram testados pelo TPF e por um teste de ELISA indireto (ELISAi). O ponto de corte empregado foi de 90 mP. Quatro animais apresentaram resultado positivo no teste de ELISAc e destes, dois foram positivos tanto no TPF quanto no ELISAi. Os dois animais eram de vida livre, apresentavam boa condição corporal e não foram submetidos a exames laboratoriais diretos para diagnóstico de brucelose.

A interpretação dos resultados de testes sorológicos para diagnóstico de brucelose em espécies silvestres deve ser realizada com cautela, pois a maioria dos protocolos empregados foram padronizados e validados para uso na espécie bovina. A avaliação criteriosa do desempenho destes testes sorológicos para uso em uma nova espécie animal requer sua avaliação em animais com condição sanitária definida (infectados e não infectados), o que se torna inviável no caso de animais aquáticos de vida livre.

Assim, soropositividade pode não necessariamente indicar que os animais apresentem infecção ativa no momento da amostragem. Estudos baseados em infecções experimentais e naturais indicam que quase todas as espécies de animais vulneráveis à infecção por *Brucella* podem apresentar declínio nos títulos de anticorpos ao longo do processo infeccioso. Assim, a real prevalência de brucelose pode ser difícil de ser determinada em ensaios sorológicos (KEID et al., 2009; GODFROID et al., 2010).

A utilização de testes laboratoriais diretos para a avaliação da condição sanitária de espécies silvestres é de fundamental importância, pois testes diretos apresentam, de maneira geral, maior especificidade diagnóstica. O teste laboratorial considerado "padrão ouro" para o diagnóstico da brucelose é o cultivo microbiológico para isolamento de *Brucella* spp. O gênero *Brucella* tem sido considerado um gênero bacteriano em expansão, em razão das novas variantes e espécies identificadas em várias espécies de hospedeiros silvestres nas últimas décadas (BARUN et al., 2007; FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2009; SCHOLZ et al., 2009, 2010; EISENBERG et al., 2013). Além disso, com o emprego do

cultivo microbiológico é possível a caracterização da estirpe de *Brucella* responsável pelas infecções (GODFROID, 2002).

Duas amostras isoladas no cultivo microbiológico que apresentaram-se na forma de cocobastonestes Gram negativos na coloração de Gram foram submetidas à PCR-ITS, apresentando resultado positivo. A amostra foi proveniente de um animal da espécie *S. fluviatilis* (animal número 812) não foi obtida em cultura pura durante os procedimentos de cultivo microbiológico, impossibilitando sua identificação bioquímica. Apesar de ter apresentado resultado positivo pela PCR-ITS, não foi possível identificar o isolado por meio do sequenciamento do gene *recA* em razão da ausência de amplificação na PCR-*recA*.

A segunda colônia bacteriana foi isolada em cultura pura a partir de amostra de suabe anal de um boto da espécie *I. geoffrensis* (animal número 417) A estirpe isolada foi identificada bioquimicamente como pertencente ao gênero *Ochrobactrum* e apresentou elevada similaridade genotípica com variantes da espécie *Ochrobactrum intermedium* pela análise das sequências do gene *recA*.

O gênero *Ochrobactrum*, assim como o gênero *Brucella*, pertence à família Brucellaceae, classe Alphaproteobacteria e possui uma ampla variedade de espécies capazes de habitar os mais diversos nichos, incluindo o solo (LEBUHN et al., 2000), ambientes industriais (HUBER et al., 2010), vegetais (TRUJILLO et al., 2005; TRIPATHI et al., 2006; ZURDO-PINERO et al., 2007; KAMPFER et al., 2008; IMRAN et al., 2010), plantas de tratamento de esgotos e águas residuárias (KAMPFER et al., 2008; WOO et al., 2011), humanos (MOLLER et al., 1999; MAHMOOD et al., 2000; STIAKAKI et al., 2002; KAMPFER et al., 2007; TEYSSIER et al., 2007; DHARNE et al., 2008; HAGIYA et al., 2013; MATTOS et al., 2013; SITI ROHANI E TZAR, 2013) e animais (KAMPFER et al., 2003, 2011; EL ADAWY et al., 2012). Algumas espécies do gênero vêm sendo estudadas pelo potencial de aplicação como biorremediadores ou como bactérias promotoras de crescimentos para plantas (PANDEY et al., 2013).

Em 1988, Holmes et al., concluíram que as bactérias pertencentes ao gênero *Ochrobactrum* eram filogeneticamente muito relacionadas às bactérias do gênero

Brucella, com base na análise do DNA codificador do RNA ribossomal da superfamília IV de *Alphaproteobacteria*. A estreita relação com *Brucella* foi novamente enfatizada em 1998 por Velasco et al., ao descrever a espécie *O. intermedium*, com a nomenclatura “intermedium” refletindo a posição intermediária entre *Ochrobactrum* e *Brucella*.

Dentre as espécies isoladas de hospedeiros animais temos *O. pecoris*, isolada de ovinos e suínos suspeitos de brucelose respectivamente na Bosnia e Alemanha. Os animais apresentaram quadros de orquite e epididimite e também resultados sorológicos positivos para *Brucella* (KAMPFER et al., 2011). Isolados de *O. pecoris* também foram obtidos do conteúdo cecal de perus (EL ADAWY et al., 2012). A espécie *O. gallinifaecis* foi isolada de amostras fecais de galinhas (KAMPFER et al., 2003).

Considerando que as bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* spp. apresentam alta patogenicidade para o homem, são classificadas como agentes de nível 3 de biossegurança. Dentre os componentes no gênero, *O. anthropi*, e *O. intermedium* foram as principais espécies envolvidas em infecções humanas, a maioria delas em indivíduos imunossuprimidos (TEYSSIER et al., 2007). A maioria das infecções causadas por *O. anthropi* e *O. intermedium* têm sido associados a intervenções médicas invasivas e procedimentos cirúrgicos (MOLLER et al., 1999; MAHMOOD et al., 2000; STIAKAKI et al., 2002; DHARNE et al., 2008; HAGIYA et al., 2013; MATTOS et al., 2013; ROHANI; TZAR, 2013). Consequentemente, ambas as espécies foram classificadas como agentes de nível 2 de biossegurança. Alguns relatos, no entanto, indicam que certas estirpes *O. anthropi* e *O. intermedium* podem causar infecções sistêmicas graves em indivíduos saudáveis, sendo confundidas com infecções por *Brucella* (KETTANEH et al., 2003; OZDEMIR et al., 2006; VAIDYA et al., 2006).

Outras espécies, também foram isoladas de pacientes humanos como *O. pseudointermedium*, (TEYSSIER et al., 2007), *O. haematophilum* e *O. pseudogrignonense* (KAMPFER et al., 2007).

Apesar de terem sido consideradas bactérias ambientais e associadas a infecções oportunistas em humanos, o número de infecções causadas por membros do

gênero *Ochrobactrum* vem aumentando nos últimos anos. Assim, estes organismos podem apresentar relevância em razão dos seguintes fatores: (i) presença de estirpes resistentes a antimicrobianos, em especial antibióticos beta lactâmicos (TEYSSIER et al., 2005; THOMA et al., 2009); (ii) serem considerados membros de um clado geneticamente relacionado ao gênero *Brucella*, patógeno estrito e zoonótico (SCHOLZ et al., 2008), tornando-os organismos de interesse para estudos que visam ao entendimento dos fatores envolvidos na evolução de bactérias ambientais como patógenos. Apesar do isolamento frequente destas bactérias, aspectos epidemiológicos relacionados às infecções humanas e animais ainda são desconhecidos, devido à ausência de investigações ambientais quando casos humanos ou animais são descritos, bem como à dificuldade de identificação laboratorial das espécies do gênero (AUJOLAT et al., 2014).

Os sistemas de identificação bacteriana rotineiramente usados e baseados em características bioquímicas, não são capazes de fazer a diferenciação entre as várias espécies de *Ochrobactrum* patogênicos, ou seja, *O. anthropi*, *O. intermedium*, *O. pseudintermedium*, *O. haematophilum*, e *O. pseudogrignonense*, uma vez que apenas *O. anthropi* está contida nas bases de dados (THOMA et al., 2009). Além disso, a elevada similaridade existentes entre *O. anthropi* e *O. intermedium* com o gênero *Brucella*, vem provocando erros na identificação destes patógenos em laboratórios clínicos (ELSAGHIR et al., 2003; KAMPFER et al 2007; HOVART et al., 2011). Assim, é possível que o número de infecções humanas por *O. intermedium* e outras espécies do gênero que não *O. anthropi* sejam subestimadas (TEYSSIER et al., 2005).

A maioria das pesquisas realizadas têm demonstrado que o *O. intermedium*, não parece ser componente da microbiota humana (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012), exceto por um único relato de detecção na pele humana em indivíduos adoid (GRICE et al., 2009). De acordo com Aujoulat et al. (2014), o fato de a bactéria ter sido isolada principalmente de pacientes humanos hospitalizados e de ambientes industriais, pode sugerir que a mesma venha sendo selecionada por atividades humanas relacionadas à medicina, industrialização e agricultura.

No presente projeto, uma estirpe de *O. intermedium* foi isolada de amostra de suabe anal de apenas um animal, dentre os amostrados. A baixa frequência de isolamento sugere não tratar-se de componente da microbiota de botos vermelhos. Não foram verificados sinais visíveis de comprometimento clínico durante a amostragem. Contudo, por ser um animal de vida livre, torna-se difícil afirmar que o indivíduo apresentava-se em estado de completa higidez, não sendo possível, portanto, fazer qualquer inferência sobre o potencial patogênico da estirpe isolada. O animal também apresentou resultado positivo pela PCR-ITS em amostra de sangue, porém, não foi possível realizar a identificação do organismo detectado no teste molecular.

Em relação ao teste de PCR aplicado diretamente nas amostras biológicas, embora tenham sido detectadas reações positivas em amostras de leite, sangue e suabe em vários animais, não foi possível identificar os organismos detectados em todas as amostras positivas. Das 12 amostras detectadas como positivas, apenas duas detectadas em leite foram caracterizadas por meio do sequenciamento do gene *recA*.

Uma delas, isolada de amostra de leite do animal 183, foi agrupada num clado contendo os microrganismos *Cellulomonas fimi*, *Cellulomonas flavigena* e *Cellvibriogilvus*, com maior similaridade com *C. fimi*. Porém, o suporte estatístico do teste não permitiu identificar a amostra como pertencente a estes gêneros bacterianos, sugerindo tratar-se possivelmente de uma espécie ainda não descrita. O gênero *Cellulomonas* pertence à família *Cellulomona daceae*, ordem Actinomycetales, classe Actinomycetales e o gênero *Cellvibrio* pertence à família *Pseudomonadaceae*, classe Gamma Proteobacteria (WHITMAN et al., 2012).

A segunda amostra, isolada de leite do animal 432, foi agrupada num clado juntamente com as bactérias *Propionicimonas paludicola*, *Micropruina glycogenica*, *Naumannella halotolerans*, com maior similaridade à espécie *Propionibacterium propionicum*. Estes organismos pertencem à família *Propionibacteriaceae* (DELWICHE, 1957), incluída na ordem Actinomycetales, classe Actinomycetales.

Atualmente, a família *Propionibacteriaceae* é composta por 15 gêneros bacterianos: *Propionibacterium* (CHARFREITAG et al., 1988), *Luteococcus* (TAMURA et

al., 1994; COLLINS et al., 2000), *Propioniferax* (YOKOTA et al., 1994), *Microlunatus* (NAKAMURA et al., 1995), *Friedmanniella* (SCHUMANN et al., 1997), *Tessaracoccus* (MASZENAN et al., 1999), *Micropruina* (SHINTANI et al., 2000), *Propionimicrobium* (STACKEBRANDT et al., 2002), *Propionicimonas* (AKASAKA et al., 2003), *Brooklawnia* (BAE et al., 2006b), *Propionicecella* (BAE et al., 2006a), *Aestuariimicrobium* (JUNG et al., 2007), *Granulicoccus* (MASZENAN et al., 2007), *Auraticoccus* (ALONSO-VEGA et al., 2011) e *Propioniciclava* (SUGAWARA et al., 2011). Bactérias da espécie *P. propionicum*, são pleomórficas, Gram positivas, de crescimentos lentos e anaeróbios, tendo sido isoladas como patógenos oportunistas em humanos com presença de abscessos (WUNDERINK et al., 2011; CHAU et al., 2012).

A ocorrência de resultados positivos na PCR-ITS e negativos na PCR-*recA* pode sugerir duas situações distintas: (i) baixa especificidade dos *primers* usados na PCR-ITS de maneira que as amostras com resultados positivos na PCR-ITS sejam pertencentes a outros gêneros bacterianos, que não *Brucella*, não sendo, portanto amplificados pela PCR-*recA* (o gene *recA* é um marcador que permite maior especificidade diagnóstica); (ii) as amostras detectadas pela PCR-ITS são pertencentes ao gênero *Brucella* contudo, a sensibilidade diagnóstica da PCR-ITS foi menor do que a PCR-*recA*, levando a um resultado falso-negativo na PCR-*recA*. Tendo em vista que a caracterização do gene *recA* em três amostras que foram positivas pela PCR-ITS, resultou na identificação de três diferentes bactérias, sugere-se que a discrepância de resultados entre a PCR-ITS e a PCR-*recA* seja de fato consequência da primeira situação descrita anteriormente. Vale ressaltar que os *primers* ITS66 e ITS279 foram desenhados no ano de 2007 (KEID et al., 2007), como ferramenta para detecção de *Brucella* em animais domésticos, num período em que o número de sequências gênicas disponíveis nos bancos de dados eram menores do que o número disponível atualmente. Alterações nos valores de especificidade de testes diagnósticos quando aplicados em diferentes contextos, como diferentes populações de hospedeiros, diferentes amostras biológicas e regiões geográficas são fenômenos esperados, em especial quando da utilização de metodologias diagnósticas de elevada sensibilidade como a PCR. Assim, a validação de sistemas de detecção molecular de patógenos é necessária na medida em que o contexto de uso é alterado (OIE, 2011).

Recentemente, foi relatado o isolamento de um microrganismo *Brucella*-like de abscessos em anfíbios das espécies *Pyxicephalusedulis* (EISENBERG et al., 2012) e *Leptopelis vermiculatus* (FISCHER et al., 2012). O organismo isolado apresentou-se na forma de cocobastonete Gram negativo, não formador de esporos e com algumas características consideradas atípicas dentro do gênero *Brucella*, como a motilidade e o crescimento rápido em meios de cultivo. O isolado foi classificado fenotipicamente como *Ochrobactrum anthropi*, mas o sequenciamento do gene codificador da unidade 16S do RNA ribossomal indicou 100% de similaridade com *Brucella inopinata*, espécie previamente isolada de implante mamário em humanos.

Devido a grande similaridade existente entre os componentes dos gêneros *Ochrobactrum* e *Brucella*, bem como o isolamento frequente de novas variantes patogênicas para animais e humanos, pertencentes a estes gêneros, a utilização de novas estratégias diagnósticas que permitam a detecção e o diagnóstico diferencial destes microrganismos seria importante para a identificação de potenciais novos patógenos, especialmente para uso em espécies silvestres de hospedeiros.

A importância sanitária destes resultados para as espécies *I. geoffrensis* e *S. fluvitalis* não pôde ser determinada em razão da impossibilidade de monitoramento clínico contínuo, por serem animais de vida livre. Assim, futuras investigações nesta população de cetáceos seriam desejáveis no sentido de ampliar o conhecimento referente à diversidade microbiana existente na população.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Não foram verificadas evidências sorológicas ou microbiológicas de infecção por *Brucella* spp. na população analisada.
- Foi isolada uma estirpe de *Ochrobactrum intermedium* de um exemplar da espécie *Inia geoffrensis*, contudo, a importância sanitária deste resultado para esta espécie de boto não pôde ser determinada.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE A. A.; TABOR A. A. Introduction: mamrine mammals as sentinels of marine ecosystem health. **EcoHealth**, 1, 2004, p. 236-238.
- AKASAKA, H.; UEKI, A.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; UEKI, K. *Propionicimonas paludicola* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil. **International journal of systematic evoluionary microbiology**, v. 53 p. 1991–1998, 2003.
- AL DAHOUK S.; TOMASO H.; NÖCKLER K.; NEUBAUER H.; FRANGOULIDIS D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis- A review of literature. **Clinical laboratory**, v. 49, p. 487-505, 2003.
- ALBA, P.; TERRACCIANO, G.; FRANCO, A.; LORENZETTI, S.; COCUMELLI, C.; FICHI, G.; ELENI, C.; ZYGMUNT, M.S.; CLOECKAERT, A.; BATTISTI, A. The presence of *Brucella ceti* ST26 in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) with meningoencephalitis from the Mediterranean Sea. **Veterinary microbiology**, v. 31, n.164(1-2), p.158-63. May, 2013.
- ALONSO-VEGA, P.; CARRO, L.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; TRUJILLO, M. E. *Auraticoccus monumenti* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a deteriorated sandstone monument. **International journal of systematic evoluionary microbiology**, n.61, p. 1098–1103, 2011.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 1976, p. 109.
- AUJOULAT, F.; ROMANO-BERTRAND, S.; MASNOU, A.; MARCHANDIN, H.; JUMAS-BILAK, E. Niches, population structure and genome reduction in *Ochrobactrum intermedium*: clues to technology-driven emergence of pathogens. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p.17, Jan 2014.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4.ed. New York: Wiley & Sons, 1999, p. 1512.
- BAE, H.-S.; MOE, W. M.; YAN, J.; TIAGO, I.; DA COSTA M. S.; RAINEY, F. A. *Propionicicella superfundia* gen. nov., sp. nov., a chlorosolvent-tolerant propionate-forming, facultative anaerobic bacterium isolated from contaminated groundwater. **Systematic and applied microbiology**, v.29, p.404–413, 2006a.
- BAE, H.-S.; MOE, W. M.; YAN J.; TIAGO, I.; DA COSTA M. S.; RAINEY F. A. *Brooklawnia cerclae* gen. nov., sp. nov., a propionate forming bacterium isolated from chlorosolvent-contaminated groundwater. **International journal of systematic evoluionary microbiology**, v.56, p. 1977–1983, 2006b.

BENGIS, R. G.; LEIGHTON, F. A.; FISCHER, J. R.; ARTOIS, M.; MÖRNER, T.; TATE, C. M. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. **Revue scientifique et technique de L' office international des epizooties**, v.23, n. 2, p.497-511, 2002.

BEST, R. C.; SILVA, V. M. F. Amazon River Dolphin, boto *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817). In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R.(Ed). **Handbook of marine mammals**, vol 4: River Dolphins and the larger toothed Whales. London: Academic Press, 1989. p. 1-24

BEST, R. C.; DA SILVA, V. M. F. Biology, status and conservation of *Inia geoffrensis* in the Amazon and Orinoco river basins. In: PERRIN, W. F.; BROWNELL, R. L.; ZHOU, K.; LU JIANKANG (ed.). **Biology and conservation of the river dolphins**. IUCN Species Survival Commission, 1989, p. 23-34

BEST, R. C.; DA SILVA, V. M. F. *Inia geoffrensis*, **Mammalian species** 426: 1-8. 1993.

BONAR, C. J.; WAGNER, R. A. A third report of "golf ball disease" in an amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*) associated with *Streptococcus iniae*. **Journal of Zoo and Wildlife medicine**, v. 34, n.3, p. 296-301, 2003.

BOSSART, G. D. Emerging diseases in marine mammals: from dolphins to manatees. **Microbe**, v.11, n.2, p. 544-549, 2007.

BOSSART G.D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Wildlife and Marine Mammals, Veterinary pathology**, 2011.

BOSSART G.D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Oceanography** v.19, n.2, p.44-47, 2006.

BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; STACK, J. A.; MACMILLAN, A. P.; STAUNTON, N. J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. **Veterinary record**, p. 144:483, 1999.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. **Veterinary microbiology**, v. 90, n°1-4, p. 435-446, 2002.

CAMARGO, Y. R.; SILVA V. M. F. Uso de habitat e comportamento do boto da Amazônia *Inia geoffrensis* na reserva de desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. In abstracts of the 8° REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL. 1998, Olinda: SOLAMAC, 1998. p. 36.

CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. 1990. Canine brucellosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.573-584.

CASSLE, S. E.; JENSEN, E. D.; SMITH, C. R.; MEEGAN, J. M.; JOHNSON, S.P.; LUTMERDING, B.; RIDGWAY, S. H.; FRANCIS-FLOYD, R. Diagnosis and successful

treatment of a lung abscess associated with *Brucella* species infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of zoo wildlife medicine**, v.44, n.2, p.495-499, Jun 2013.

CFSPH; The Center for Food Security and Public Health. Brucellosis in marine Mammals. **College of veterinary medicine** Iowa State University. Ames, Iowa 50011, 2007.

CHARFREITAG, O.; COLLINS, M. D.; STACKEBRANDT, E. Reclassification of *Arachnia propionica* as *Propionibacterium propionicus* comb. nov. **International journal of systematic bacteriology**, v.38, p.354–357, 1988.

CHAU, A. M. T.; XU, L. L.; FAIRHALL, J. M.; MCMULLAN, B. J. Brain abscess due to *Propionibacterium propionicum* in Eisenmenger syndrome. **Medical journal of Australia**, v.196, n.8, 2012.

CLAVAREAU, C.; WELLEMAN, V.; WALRAVENS, K.; TRYLAND, M.; et al. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). **Microbiology**, v. 144, p.3267–3273, 1998.

COLLINS, M. D.; LAWSON, P. A.; NIKOLAITCHOUK, N.; FALSEN, E. *Luteococcus peritonei* sp. nov., isolated from the human peritoneum. **International journal of systematic evolutionary microbiology**, v.50, p.179–181, 2000.

CORBEL, M. J. Brucellosis in humans and animals. Geneva, Switzerland, 2006.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. Detections of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Australian veterinary journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

CULIK, B. (2010) Odontocetes. The toothed whales: "*Inia geoffrensis*". UNEP/CMS Secretariat, Bonn, Germany.

CUNNINGHAM, A. A. A Walk on the wild side-emerging wildlife diseases. **British medical journal**, v.331, p. 1214-1214, 2005.

CURRIER, C. W.; RAITHEL, W. F.; MARTIN, R. J. et al. Canine brucellosis. **Journal of the American veterinary medical association**, v. 180, n.2, p. 132-133, 1982.

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.

DA SILVA, V. M. F.; R. C. BEST. 1994. Tucuxi—*Sotalia fluviatilis* in RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R. J. (ed.). **Handbook of marine mammals**. The first book of dolphins. Vol.5. Academic Press: Gervais, 1853. p.43–69.

- DAGLEISH, M. P.; BARLEY, J.; FINLAYSON, J.; REID, R. J.; FOSTER, G. *Brucella ceti* associated pathology in the testicle of a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 139, p.54-59, 2008.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife- threats to biodiversity and human health. **Science**, v.287, n.5452, p.443-449, 2000.
- DAVISON, N. J.; BARNETT, J. E.; PERRETT, L. L.; DAWSON, C. E.; PERKINS, M. W.; DEAVILLE, R. C.; JEPSON, P. D. Meningoencephalitis and arthritis associated with *Brucella ceti* in a short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*). **Journal of wildlife diseases**, v.49, n.3, p.632-636, Jul 2013.
- DAWSON, C. E.; STUBBERFIELD, E. J.; PERRETT, L. L. Phenotypic and molecular characterization of *Brucella* isolates from marine mammals. **BMC microbiology**, v.8, p.224, 2008.
- DELWICHE, E. A. Family XI. Propionibacteriaceae fam. nov. **In Bergey's Manual of determinative bacteriology**, 7th ed, p. 569. Edited by BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; SMITH, N. R. London: Ballie`re, Tindall & Cox, 1957.
- DHARNE, M. S.; MISRA, S. P.; MISRA, V.; DWIVEDI, M.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. Case Report Isolation of urease-positive *Ochrobactrum intermedium* in the stomach of a non-ulcer dyspeptic patient from north India. **Journal of microbiology and immunology infection**, v.41, p.183-186, 2008.
- EISENBERG, T.; HAMANN, H. P.; KAIM, U.; SCHLEZ, K.; SEEGER, H et al. Isolation of Potentially Novel *Brucella* spp. from Frogs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 3753-3755, 2012.
- EL ADAWY, H.; HOTZEL, H.; TOMASE, H.; NEUBAUER, H.; HAFEZ, H. M. Isolation and characterization of *Ochrobactrum anthropi* and *Ochrobactrum pecoris* from caecal contente of comercial turkeys. **Veterinary microbiology** , p.349-354, 2012.
- EL-TRAS, W. F.; TAYEL, A. A.; ELTHOLTH, M. M.; GUITIAN, J. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Veterinary microbiology*, v. 141, p. 321-325, 2010.
- ELSAGHIR, A. A.; JAMES, E. A. Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by API 20NE, **Journal of medical microbiology**, v.52, p.441-442, 2003.
- EPISTEIN, P. R.; CHIVIAN, E.; FRITH, K. Emerging diseases threaten conservation. **Environmental health perspectives**, v.111, p.A506-A507, 2003.
- EWALT, D. R.; PAYEUR, J. B.; MARTIN, B. M.; CUMMINS, D. R.; MILLER, W. G. Characteristics of a *Brucella* species from a bottle-nosed-dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of veterinary diagnosis investigation**, v.6, p. 448-452, 1994.

FISCHER, D.; LORENZ, N.; HEUSER, W.; KÄMPFER, P.; SCHOLZ H. C.; LIERZ, M. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). **Journal of zoo and wildlife medicine**, v.43, n.3, p.625-628, 2012.

FORBES, L. B.; NIELSEN, O.; MEASURES, L.; EWALT, D. R. Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada. **Journal of wildlife diseases**, v.36, p.595-598, 2000.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov and *Brucella pinnipedialis* sp. nov for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of systematic evolutionary Microbiology**, v.57, p. 2688-2693, 2007.

FOSTER, G.; MACMILLAN, 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**, 90:563-580, 2002.

GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. **Revue scientifique et technique de L'office international des epizooties**, v.21, p.277-286, 2002.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, 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**, Indra, EDP Sciences, v.36, p. 313-326, 2005.

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

GONZÁLEZ, L.; PATTERSON, I. A.; REID, R. J.; FOSTER, G.; BARBERÁN, M.; BLASCO, J. M.; KENNEDY, S.; HOWIE, F. E.; GODFROID, J.; MACMILLAN, A. P.; SCHOCK, A.; BUXTON, D. Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* sp. infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). **Journal of Comparative Pathology**, v.126, n.2-3, p.147-152, 2002.

GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; MORALES, J. A.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; BARQUERO-CALVO, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; MORENO, E. Pathology of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) infected with *Brucella ceti*. **Journal of comparative pathology**, v.142, n.4, p. 347-352, 2010.

GREINER, M.; VERLOO, D.; DE MASSIS, F. Meta-analytical equivalence studies on diagnostic tests for bovine brucellosis allowing assessment of a test against a group of comparative tests. **Preventive veterinary medicine**, v.92, p. 373-81, 2009.

GRICE, E. A.; KONG, H. H.; CONLAN, S.; DEMING, C. B.; DAVIS, J. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. **Science**, v.324, p. 1190-1192, 2009.

GUZMÁN-VERRI, C.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; MORALES, J. A.; BAQUERO-CALVO, E.; CHÁVES-OLARTE, E.; MORENO, E. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v.2, p. 3/1-3/22, Feb 2012.

HAGIYA, H.; OHNISHI, K.; MAKI, M.; WATANABE, N.; MURASE, T. Clinical Characteristics of *Ochrobactrum anthropi* Bacteremia. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 4, p.1330–1333, 2013.

HERNÁNDEZ-MORA, G.; MANIRE, C. A.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; BARQUERO-CALVO, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; STAGGS, L.; THOMPSON, R.; CHAVES-OLARTE, E.; MORENO, E. Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes. **Clinical and vaccine immunology**, v.16, n.6, p. 906–915, 2009.

HERNANDEZ-MORA, G.; GONZALEZ-BARRIENTOS, R.; MORALES, J. A.; CHAVES-OLARTE, E.; GUZMAN-VERRI, C.; BAQUERO-CALVO, E.; DE-MIGUEL, M. J.; MARIN, C. M.; BLASCO, J. M.; MORENO, E. Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica. **Emerging infectious diseases**, v.14, p.1825, 2008.

HIPÓLITO, O. M. G.; FREITAS – FIGUEIREDO, J. B. 1965. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. 4 edição, ver. Ampl. Edições Melhoramentos, S. Paulo, p. 495.

HOLMES, B.; POPOFF, M.; KIREDJIAN, M.; KERSTERS, K. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd, **International journal of systematic bacteriology**, v. 38, p. 406–416, 1988.

HOVAR, R. T.; EL ATROUNI, W.; HAMMOUD, K.; HAWKINSON, D.; COWDEN, S. Ribosomal RNA sequence analysis of *Brucella* infection misidentified as *Ochrobactrum anthropi* infection. **Journal of clinical Microbiology**, v. 49, p. 1165–1168, 2011.

HUBER, B.; SCHOLZ, H.C.; KÄMPFER, P.; FALSEN, E.; LANGER, S.; BUSSE, H. *Ochrobactrum pituitosum* sp. nov., isolated from an industrial environment. **International journal of systematic evoluionary microbiology**,v. 60, p.321–326, 2010.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. A framework for human microbiome research. *Nature* 486: 215–221.; 2012.

JAHANS, K.L.; FOSTER, G.; BROUGHTON, E. S. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. **Veterinary microbiology**, v.57, p. 373-382, 1997.

JEPSON, P. D.; BREW, S.; MACMILLAN, A. P.; BAKER, J. R.; BARNETT, J.; KIRKWOOD, J. K.; KUIKEN, T.; ROBISON, I. R.; SIMPSON, V. R. Antibodies to *Brucella* in marine mammals stranded along the coast of southern New England and Wales. **Veterinary record**, v. 141, p.513-515, 1997.

JESSUP, D. A.; MILLER, M.; AMES, J.; HARRIS, M.; KREUDER, C.; CONRAD, P. A.; MAZET, J. A. K. Southern sea otter as a sentinel of marine ecosystem health. **Ecohealth**, v.1, p.239-245, 2004.

JOHNSON, C. A.; WALKER, R. D. Clinical signs and diagnosis of *B.canis* infection. **Compendium on continuing education for the practising veterinarian**, v.14, p.763-772, 1992.

JUNG, S. -Y.; KIM, H. -S.; SONG, J. J.; LEE, S. -G.; OH, T. -K.; YOON, J. -H. *Aestuariimicrobium kwangyangense* gen. nov., sp. nov., an LL diaminopimelic acid containing bacterium isolated from tidal flat sediment. **International journal of systematic evoluinary microbiology**, v.57, p.2114–2118, 2007.

KAMPFER, P.; HUBER, B.; BUSSE, H.; SCHOLZ, H. C; TOMASO, H.; HOTZEL, H.; MELZER, F. *Ochrobactrum pecoris* sp. Nov., isolated from farm animals. **International journal of systematic evoluinary microbiology**, v.61, p.2278-2283, 2011.

KAMPFER, P.; CITRON, D. M.; GOLDSTEIN, E. I. C.; SCHOLZ, H. C. Difficulty in the identification and differentiation of clinically relevant *Ochrobactrum* species. **Journal of medical microbiology**, vol. 56, n. 11, p. 1571-1573, 2007.

KAMPFER, P. S.; BUCZOLITS, A.; ALBRECHT; H. J.; BUSSE, E.; STACKEBRAND, T. Towards a standarized format for the description of a novel species (of an established genus): *Ochrobactrum gallinifaecis* sp. nov. **International journal of systematic evoluinary microbiology**, vol. 53, p.893–896, 2003.

KAMPFER, P.; SCHOLZ, H. C.; FALSEN, E.; BUSSE, H. J. *Ochrobactrum haematophilum* sp. nov. and *Ochrobactrum pseudo-grignonense* sp. nov., isolated from human clinical specimens. **International journal of systematic evoluinary microbiology**, v.57, p.2513–2518, 2007.

KAMPFER, P.; SESSITSCH, A.; SCHLOTER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.-J.; SCHOLZ, H. C. *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the envir- onment. **International journal of systematic evoluinary microbiology**, v.58, p.1426–1431, 2008.

KASTELEIN, R. A.; NEUROH, B.; NIEUWSTRATEN, S. H.; WIEPKEMA, P. R. Aquatic Mammals, Food consumption and boby measurements of Amazon River Dolphins (*Inia geoffrensis*), v.25, n.3, p. 173-182, 1999.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RITCHTZENHAIN, L. J. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. **Research in Veterinary Science**, v.86, p.22-26, 2009.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; SALGADO, V. R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella*

canis in vaginal swabs of naturally infected bitches. **Theriogenology**, v.68, n.9, p.1260-70, 2007a.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VIEIRA, N. R.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; VASCONCELLOS S. A.; DA COSTA, M.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. **Veterinary research communications**, v.31, n.8, p.951-65, 2007b.

KETTANEH, A.; WEILL, F. X.; POILANE, I.; FAIN, O.; THOMAS, M.; HERRMANN, J. L.; HOCQUELOUX, L. Septic shock caused by *Ochrobactrum anthropi* in an otherwise healthy host, **Journal of clinical microbiology**, v.41, p. 1339–1341, 2003.

LAGE A, P.; ROXO, E.; MÜLLER, E. E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J. C. M.; FERREIRA NETO, J. S.; MOTA P. M. P. C.; GONÇALVES, P. S. P. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 188 p.

LEBUHN, M.; ACHOUAK, W.; SCHLOTTER, M.; BERGE, O.; MEIER, H.; BARAKAT, M.; HARTMANN, A.; HEULIN, T. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov, **International journal of systematic evolutionary microbiology**, v.50, p. 2207–2223, 2000.

LONGO, M.; MALLARDO, K.; MONTAGNARO, S.; De MARTINO, L.; GALLO, S.; FUSCO, G.; GALIERO, G.; GUARINO, A.; PAGNINI, U.; IOVANE, G. Shedding of *Brucella abortus* rough mutant strain RB51 in milk of water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Preventive veterinary medicine**, v.90, n.1-2, p.113-118, 2009.

MAHMOOD, M.S.; SARWARI, A. R.; KHAN, M. A.; SOPHIE, Z.; KHAN, E.; SAMI, S. Infective endocarditis and septic embolization with *Ochrobactrum anthropi*: case report and review of literature, **Journal of infection**, v.40, p. 287–290, 2000.

MANUAL OF STANDARDS FOR DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES. Paris: Office International des Epizooties; 2009.

MARATEA, J.; EWALT, D. R.; FRASCA, S.; DUNN, J. L.; DE GUISE, S.; SZKUDLAREK, L.; AUBIN, D. J.; FRENCH, R. A. Evidence of *Brucella* sp. infection in marine mammals stranded along the coast of southern New England. **Journal of zoo and wildlife medicine**, v.34, n.3, p. 256-261, 2003.

MASZENAN, A. M.; JIANG, H. L.; TAY, J.-H.; SCHUMANN, P.; KROPPESTEDT, R. M.; TAY, S. T.-L. *Granulicoccus phenolivorans* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive, phenol-degrading coccus isolated from phenol-degrading aerobic granules. **International journal of systematic evolutionary microbiology**, v.57, p.730–737, 2007.

- MASZENAN, A.M.; SEVIOUR, R. J.; PATEL, B. K. C.; SCHUMANN, P.; REES, G.N. *Tessaracoccus bendigoensis* gen. nov., sp. nov., a grampositive coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass. **International journal of systematic bacteriology**, v.49, p.459–468, 1999.
- MATTOS, F.B.; SARAIVA, F.P.; ANGOTTI-NETO, H.; PASSOS, A.F. Outbreak of *Ochrobactrum anthropi* endophthalmitis following cataract surgery. **The journal of hospital infection**, v.83, p. 337-340, 2013.
- MCDONALD, W.L.; JAMALUDIN, R.; MACKERETH, G.; HANSEN, M.; HUMPHREY, S.; SHORT, P. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. **Journal of clinical microbiology**, v.44, p.4363-4370, 2006.
- MCGIVEN, J. A.; TUCKER, J. D.; PERRETT, L. L.; STACK, J. A.; BREW, S. D.; MACMILLAN, A. P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT , CFT, and iELISA. **Journal of Immunological methods**, v. 278, p. 171-178, 2003.
- MEEGAN, J.; DUNN, J. L.; VENN-WATSON, S. K.; SMITH, C. R.; SIDOR, I.; JENSEN, E. D.; VAN BONN, W. G.; PUGH, R.; FICHT, T.; ADAMS, L. G.; NIELSEN, K.; ROMANO, T. A. Serologic response in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* infected with *Brucella* sp. using a dolphin-specific indirect ELISA. **Diseases of aquatic organisms**, v.102, n.1, p.73-85, 2012.
- MEEGAN, J.; FIELD, C.; SIDOR, I.; ROMANO, T.; CASINGHINO, S.; SMITH, C.R.; KASHINSKY, L.; FAIR, P. A.; BOSSART, G.; WELLS, R.; DUNN, J. L. Development, validation, and utilization of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Brucella* species in marine mammals. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.22, n.6, p.856–862, 2010.
- MILLER, W. G.; ADAMS, L. G.; FICHT, T. A.; CHEVILLE, N. F.; PAYEUR, J. P.; HARLEY, D. R.; HOUSE, C.; RIDGWAY, S. H. Brucella-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal of zoo wildlife medicine**, v.30, p.100-110, 1999.
- MÖLLER, L. V. M.; ARENDS, J. P.; HARMSSEN, H. J. M.; TALENS, A.; TERPSTRA, P.; SLOOFF, M. J. H. *Ochrobactrum intermedium* Infection after Liver Transplantation. **Journal of clinical microbiology**, p. 241–244, 1999.
- MOORE S.E. Marine mammals as ecosystem sentinels. **Journal of mammalogy**, v.89, p.534-540, 2008.
- MYERS, D.M. & VARELA-DIAZ, V.M. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. *Cornell. Vet.*, v.70, p.258-265, 1980.

NAKAMURA, K.; HIRAISHI, A.; YOSHIMI, Y.; KAWAHARASAKI, M.; MASUDA, K.; KAMAGATA, Y. *Microlunatus phosphovorus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. **International journal of systematic bacteriology**, v.45, p. 17–22, 1995.

NAVARRO, E.; ESCRIBANO, J.; FERNANDEZ, J. A.; SOLERA, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **Immunology and medical microbiology**, v.34, n.2, p. 147-151, 2002.

NIELSEN, K. et al. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 66, p. 321 - 329, 1998.

NEIMANIS, A. S.; KOOPMAN, H. N.; WESTGATE, A. J.; NIELSEN, K.; LEIGHTON, F. A. Evidence of exposure to *Brucella* sp. in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Bay of Fundy, Canada. **Journal of wildlife diseases**, v. 44, p.480–485, 2008.

NIELSEN, O.; STEWART, R. E.; NIELSEN, K.; MEASURES, L.; DUGNAN P. Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America. **Journal of wildlife diseases**, v.37, n.1, p.89–100, 2001.

NIELSEN, O.; NIELSEN, K.; BRAUN, R.; et al. A comparison of four serological assays in screening for *Brucella* exposure in Hawaiian monk seals. **Journal of wildlife diseases**, v. 41, n.1, p. 126-133, 2005.

NIELSEN, O.; NIELSEN, K.; STEWART, R. E. A. Serological evidence of *Brucella* spp. exposure in Atlantic walruses (*Odobenus rosmarus rosmarus*) and ringed seals (*Phoca hispida*) of Arctic Canada. **Arctic**, v. 49, p.383-386, 1996.

NIELSEN, O.; STEWART, R. E. A.; NIELSEN, K., et al. Serological survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America. **Journal of wildlife diseases**, v.37, p.89-100, 2001.

NYMO, I.H.; TRYLAND, M.; GODFROID, J. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded Seal (*Cystophora cristata*). **Veterinary research**, v.42, p. 93, 2011.

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. 1119-1204, 2004.

OHISHI, K.; ZENITANI, R.; BANDO, T.; GOTO, Y.; UCHIDA, K.; MARUYAMA, T.; YAMAMOTO, S.; MIYAZAKI, N.; FUJISE, Y. Pathological and serological evidence of *Brucella* infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific. **Comparative immunology and microbiology**, v.26, p.125-136, 2003.

OIE (World Organization for Animal Health). Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris. Disponível em:

[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm]. 2009.

OIE (World Organization for Animal Health). Working Group on Wildlife Diseases. Paris. Disponível em <http://www.oie.int/wildlife/eng/en_wildlife.htm> Acesso em 01 ago. 2011.

OMATA, Y.; UMESHITA, Y.; WATARAI, M.; TACHIBANA, M.; SASAKI, M.; MURATA, K.; YAMADA T. Investigation for presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* species infection in killer whales (*Orcinus orca*) mass-stranded on the coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. **Journal of veterinary medical science**, v.68, n.5, p.523-526, 2006.

OZDEMIR, D.; SOYPACACI, Z.; SAHIN, I.; BICIK, Z.; SENCAN, I. *Ochrobactrum anthropi* endocarditis and septic shock in a patient with no prosthetic valve or rheumatic heart disease: case report and review of the literature, Jpn. **Journal of infectious diseases**, v.59, p.264–265, 2006.

PANDEY, S.; GHOSH, P. K.; GHOSH, S.; DE T.K.; MAITI, T.K. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. **Journal of Microbiology**, v. 51, p. 11–17, 2013.

PAYENE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a rec A gene-based identification approach for the entire burkholderia genus. **Applied and environmental microbiology**, v.71, n°7, p. 3917-3927, 2005.

PAYEUR, J. B.; CARPENTER, L.; EWALT, D. R.; GARNER, M. M.; JEFFRIES, S. J.; LAMBOURN, D. M.; NORBERG, B.; POLZIN, L.; RHYAN, J. C. Evidence of *Brucella* sp infection in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsii*), California sea lions (*Zalophus californianus*) and harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) in Puget Sound, Washington. Proc. **Wildlife diseases association**, p. 161-165, 1997.

PRENGER-BERNINGHOFF, E.; SIEBERT, U.; STEDE, M.; KOENIG, A.; WEISS, R.; BALJER, G. Incidence of *Brucella* species in marine mammals of the German north sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.81, p.65-71, 2008.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Medical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, p. 261-267, 1994.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Diseases caused by *Brucella* spp. In Veterinary Medicine. **A textbook of the diseases of cattle, sheeps, pigs, goats and horses**. 9 edition. Edited by Roadostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelohia, St. Louis, Sydney, Toronto: Elsevier Limited, 2000, p.867-882.

RANDOLPH, S. E. Perspectives on climate change impacts on infectious diseases. **Ecology**, v.90, p. 927-931, 2009.

REEVES, R.; LEATHERWOOD, S. Dolphins, Porpoises and Whales: 1994-1998. **Action plan for conservation of cetaceans**. Gland, Switzerland, IUCN/SSC cetaceans specialist group, p. 91, 1994.

REEVES, R. R.; JEFFERSON, T. A.; KARCZMARSKI, L.; LAIDRE, K.; O’CORRY-CROWE, G.; ROJAS-BRACHO, L.; SECCHI, E. R.; SLOOTEN, E.; SMITH, B. D.; WANG, J. Y.; ZHOU, K. 2011. *Inia geoffrensis*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 April, 2014.

RHYAN, J. C.; GIDLEWSKI, T.; EWALT, D. R.; HENNAGER, S. G.; LAMBOURNE, D. M.; OSLEN, S. C. Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. isolated from a Pacific harbor Seal (*Phoca vitulina richardisi*). **Journal of veterinary diagnosis investigation**, v.13, p. 379-382, 2001.

RICE, D.W. **Marine mammals of the world: systematics and distribution**. Society for Marine Mammalogy, Lawrence, Kansas. 1998.

ROSS H. M.; FOSTER G.; REID R. J.; et al. *Brucella* species infection in sea mammals. **Veterinary records**, v.134, p. 359-364, 1994.

ROSS H.M.; JAHANS K.L.; MACMILLAN A.P.; REID R.J.; THOMPSON P.M.; FOSTER G. *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean populations. **Veterinary records**, v.138, p.647-648, 1996.

RYCHLIK, W.; RHOADS, R. E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. **Nucleic Acid research**, v.17, p. 8543-51, 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, P. S.; ALBUQUERQUE, G. R.; DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R.; MARVULO, M. F. V.; SOUZA, S. L. P.; RAGOZO, A. M. A.; NASCIMENTO, C. C.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. R. C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p.171-173, 2011.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E. et al. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. **Journal of Medical Primatology**, v.38, p.70-73, 2009.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; JAMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MASQUART, M.;

ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A.M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLHER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCLER, K. *Brucella microti* sp., nov., isolated from the commom vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic Evoluinary Microbiology**, v.58, p. 375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; DAHOUK, S.; TOMASO, H.; NEUBAUER, H.; WITTE, A.; SCHOLTER, M.; KAMPFER, P.; FALSEN, E.; PFEFFER, M.; ENGEL, M. Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belongin to the Ochrobactrum- Brucella group by rec A and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis. **Sistematic and applied microbiology**, ELSEVIER, v. 31, p.1-16, 2008.

SCHOLZ, H. C.; PFEFFER, M.; WITTE, A.; NEUBAUER, H.; AL DAHOUK, S.; WERNEY, U.; TOMASO, H. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the recA gene. **Journal of medical microbiology**, v. 57, p. 64- 71, 2008b.

SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLECHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRUGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. **Vector borne zoonotic diseases**, v.9, p. 153-155, 2009.

SCHOLZ, H. C.; NOCKLERK, K.; GOLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KAMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International journal of systematic evoluinary microbiology**, v.60, p.801-808, 2010.

SCHUMANN, P.; PRAUSER, H.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E.; HIRSCH, P. *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an LL diaminopimelic acid-containing actinomycete from Antarctic sandstone. **International journal of systematic bacteriology**, v. 47, p.278–283, 1997.

SCHWABE C.W. **Veterinary medicine and human health**, second edition. The Williams & Wilkins Company, USA. p. 112, 1969.

SECCHI, E. R. 2010. Review on the threats and conservation status of franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae). In: RUIZ-GARCÍA, M. and SHOSTELL, J. (ed.) **Biology, evolution and conservation of river dolphins within South America and Asia**. Nova Science, New York, p. 323-339.

SECCHI, E. R. 2012. *Sotalia fluviatilis*. In: IUCN 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 April 2014.

SHINTANI, T.; LIU, W. T.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; MIYAOKA, S.; SUZUKI, T.; NAKAMURA, K. *Micropruina glycogenica* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge. **International journal of systematic evoluinary microbiology**, v.50, p.201–207, 2000.

SIDOR, I.F.; DUNN, J. L.; TSONGALIS, G. J.; CARLSON, J.; FRASCA, S. JR. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* species in tissues, blood, and feces from marine mammals. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.25, n.1, p.72-81, Jan 2013.

SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R.; ROSAS, F. C. W.; MARMONTEL, M. Mamíferos Aquáticos na Estação Ecológica do Lago de Mamirauá (EELM), Amazonas, Brasil. Florianópolis, imprensa universitária, 1994, p. 28-31.

SITI ROHANI, A.H.; TZAR, M. N. *Ochrobactrum Anthropi* Catheter-Related Bloodstream Infection : The First Case Report In Malaysia. **Medical journal of Malaysia**, v. 68 n.3, June 2013.

SLENNING, B. D. Global climate change and implications for disease emergence. **Veterinary pathology**, v.47, p. 28-33, 2010.

SOHN, A. H.; PROBERT, W. S.; GLASER, C. A.; GUPTA, N.; BOLLEN, A. W.; WONG, J. D.; GRACE, E. M.; MCDONALD, W. C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. **Emerging infectious diseases**, v.9, p.485-488, 2003.

STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P.; SCHAAL, K. P.; WEISS, N. *Propionimicrobium* gen. nov., a new genus to accommodate *Propionibacterium lymphophilum* (Torrey 1916) Johnson and Cummins 1972, 1057AL as *Propionimicrobium lymphophilum* comb.nov. **International journal of systematic evolutionary microbiology**, v.52, p.1925–1927, 2002.

STIAKAKI, E.; GALANAKIS, E.; SAMONIS, G.; CHRISTIDOU, A.; MARAKA, S.; TSELENTIS, Y.; KALMANTI, M. *Ochrobactrum anthropi* bacteremia in pediatric oncology patients, *Pediatr. Journal of infectious diseases*, v.21, p. 72–74, 2002.

STUART, R. D. Transport Medium for specimens in Public Health Bacteriology. **Public Health Reports** v. 74, n. 5, p. 431-438, 1959.

SUGAWARA, Y.; UEKI, A.; ABE, K.; KAKU, N.; WATANABE, K.; UEKI, K. *Propioniciclava tarda* gen. nov., sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. **International journal of systematic evolutionary microbiology**, v.61, p.2298–2303, 2011.

TACHIBANA, M.; WATANABE, K.; KIM, S.; OMATA, Y.; MURATA, K.; HAMMOND, T.; WATARAI, M. Antibodies to *Brucella* spp. in Pacific bottlenose dolphins from the Solomon Islands. **Journal of wildlife diseases**, v.42, p. 412-414, 2006.

TAMURA, T.; TAKEUCHI, M.; YOKOTA, A. *Luteococcus japonicas* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive coccus with LL-diaminopimelic acid in the cell wall. **International journal of systematic bacteriology**, v.44, p. 348–356, 1994.

TEYSSIER, C.; MARCHANDIN, H.; MASNOU, A.; JEANNOT, J-L.; DE BUOCHBERG, M. et al. Pulsed-field gel electrophoresis to study the diversity of whole-genome organization in the genus *Ochrobactrum*. **Electrophoresis**, v. 26, p. 2898–2907, 2005.

TEYSSIER, C.; MARCHANDIN, H.; MASNOU, J. A.; DUSART, G.; JUMAS-BILAK, E. *Ochrobactrum pseudointermedium* sp. Nov., a novel member of the family Brucellaceae, isolated from human clinical samples. **International journal of systematic evoluionary microbiology**, v.57, p.2513–2518, 2007.

THOMA, B.; STRAUBE, E.; SCHOLZ, H. C.; AL DAHOUK, S.; ZÖLLER, L.; PFEFFER, M.; NEUBAUER, H.; TOMASO, H. Identification and antimicrobial susceptibilities of *Ochrobactrum* spp. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, p. 209–220, 2009.

TRIPATHI, A. K.; VERMA, S. C.; CHOWDHURY, S.P.; LEBUHN, M.; GATTINGER, A.; SCHLOTER, M. *Ochrobactrum oryzae*., nov., an endophytic bacterial species isolated from deep-water rice in India. **International journal of systematic evoluionary microbiology**, v.56, 1677-1680, 2006.

TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; RIVAS, R.; LUDEÑA, D.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELÁSQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp . nov . **Applied and environmental microbiology**, p. 1318–1327, Mar, 2005.

TRYLAND, M.; KLEIVANE, L.; ALFREDSSO, N. A.; KJELD, M.; ARNASON, A.; STUEN, S.; GODFROID, J. Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. **Veterinary records**, v.144, p.588-592, 1999.

TRYLAND, M.; SORESEN, 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.

VAIDYA, S.A.; CITRON, D.M.; FINE, M.B.; MURAKAMI, G.; GOLDSTEIN, E. J. Pelvic abscess due to *Ochrobactrum anthropi* in an immunocompetent host: case report and review of the literature, **Journal of clinical microbiology**, v.44, p.1184–1186, 2006.

VAN BRESSEM, M. F.; RAGA, J. A.; Di GUARDO, G.; JEPSON, P. D.; DUIGNAN, P. J.; SIEBERT, U.; BARRET, T.; SANTOS, M. C.; MORENO, I. B.; SICILIANO, S.; AGUILAR, A.; WAEREBEECK, K. V. Emerging Infectious Diseases in Cetaceans Worldwide and possible role of environmental stressors. **Diseases of aquatic organisms**, v. 86, p.143-157, 2009.

VAN BRESSEM, M. F.; VAN WAEREBEEK, K.; RAGA, J. A.; GODFROID, J.; BREW, S. D.; MACMILLAN, A. P. Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the south Pacific and the Mediterranean. **Veterinary records**, v.148, p. 657-661, 2001.

VELASCO, J.; ROMERO, C.; LOPEZ-GONI, I.; LEIVA, J.; DIAZ, R.; MORIYON, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp., **International journal of systematic bacteriology**, v.48, p. 759–768, 1998.

WALTZEK, T. B.; CORTÉS-HINOJOSA, G.; WELLEHAN, JR. J. F. X.; GRAY, G. C. Marine mammal Zoonoses: A review of disease Manifestations. **Zoonoses and public health**, p.1-11, 2012.

WHATMORE, A. M.; DAWSON, C.; GROUSSAUD, P.; KOYLASS, M. S.; KING, A.; SHANKSTER, S. J.; SOHN, A. H.; PROBERT, W. S.; MCDONALD, W. L. A marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection. **Emerging Infectious diseases**, v. 14, p.517-518, 2008.

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H.-J.; TRUJILLO, M.E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K.-i.; Parte, A. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Williams & Wilkins, 1984 2nd ed. 2012, 1750, p. 297.

WILLIAMS, E. S.; YUILL, T.; ARTOIS, M.; FISCHER, J.; HAIGH S. A. Emerging infectious diseases in wildlife. **Revue scientifique et technique**, v.21, n.1, p.139-57, 2002.

WOO, S.; TEN, L. N.; PARK, J.; LEE, M. *Ochrobactrum daejeonense* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from sludge of a leachate treatment plant. **International journal of systematic evolutionary microbiology**, v.61, p. 2690–2696, 2011.

WUNDERINK, H. F., LASHLEY, E. E. L. O.; VAN POELGEEST, M. I. E.; GAARENSTROOM, K. N.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, E. J. Pelvic Actinomycosis-Like Disease Due to *Propionibacterium propionicum* after Hysteroscopic Removal of an Intrauterine Device. **Journal of clinical microbiology**, p. 466–468, Jan. 2011.

YOKOTA, A.; TAMURA, T.; TAKEUCHI, M.; WEISS, N.; STACKEBRANDT, E. Transfer of *Propionibacterium innocuum* Pitcher and Collins 1991 to *Propioniferax* gen. nov. as *Propioniferax innocua* comb. nov. **International journal of bacteriology**, v. 44, p.579–582, 1994.

ZURDO-PIÑERO, J. L.; RIVAS, R.; TRUJILLO, M. E.; VIZCAÍNO, N.; CARRASCO, J. A.; CHAMBER, M.; PALOMARES, A.; MATEOS, P.F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. *Ochrobactrum cytisi* sp. Nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. **International journal of systematic evolutionary microbiology**, v.57, p. 784-788, 2007.