








NOTA CIENTÍFICA

Katarine de Souza Rocha¹ 
Michele de Souza Lima¹ 
Giselle Souza da Paz² 
Hélio Langoni² 
Carla Cristina Guimarães de Moraes^{1*} 

¹ Universidade Federal do Pará. Instituto de Medicina Veterinária. Castanhal. BR 316, km 62, S / N, Bairro Saudade, 68740-970, Castanhal, PA, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Distrito de Rubião Júnior, S / N, 18618-970, Botucatu, SP, Brasil.

*Autor Correspondente:
E-mail: ccmoraes@ufpa.br

PALAVRAS-CHAVE

Infecções
Bubalinos
Abate
Frigorífico

KEYWORDS

Infections
Bubalina
Slaughter
Cold-storage room

Detecção de anticorpo anti-*Brucella* sp. e anti-*Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) abatidos em matadouro na cidade de Belém, Pará

Detection of antibody anti-Brucella sp. and anti-Leptospira spp. in buffalos (Bubalus bubalis) slaughtered in a slaughterhouse in the city of Belém, Pará

RESUMO: Este estudo teve como objetivo detectar a presença de búfalos soro reagentes para *Brucella* sp. e *Leptospira* spp. Foram utilizadas amostras de soro de 113 animais provenientes da Ilha do Marajó, abatidos em matadouro frigorífico na cidade de Belém-PA, as quais foram submetidas ao teste de soroprecipitação rápida em placa com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e a prova 2-Mercaptoetanol (2-ME) para a pesquisa de anticorpos contra *Brucella* sp. e ao Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) para pesquisa de aglutininas contra *Leptospira* spp. Das 113 amostras analisadas, 13,3% (15/113) foram reagentes para anticorpos de *Brucella* sp. no AAT e 6,1% (7/113) foram confirmada na prova de 2-ME. Para *Leptospira* spp., 35,4% (40/113) dos bubalinos foram reagentes com o sorovar Hardjo C.T.G., presente em 75% (30/40) das reações. Foram detectados anticorpos contra os agentes pesquisados, demonstrando a necessidade de se fazer um controle sanitário mais eficiente no rebanho.

ABSTRACT: The present study aimed to detect the presence of buffalos serum reagents for *Brucella* sp. and *Leptospira* spp. Serum samples from 113 animals from Marajó Island, slaughtered at a slaughterhouse in the city of Belém, Pará, were used, which were submitted to the Rapid Agglutination Test with buffered, acidified plate antigen (BAPA) and 2-Mercaptoethanol (2-ME) for the detection of antibodies against *Brucella* sp. and the Microscopic Agglutination Test (MAT) for the detection of agglutinins against *Leptospira* spp. From the 113 samples analyzed, 13.3% (15/113) were reagents for *Brucella* sp. antibodies in AAT and 6.1% (7/113) were confirmed in the 2-ME test. For *Leptospira* spp., 35.4% (40/113) of the buffalos were reactive with serovar Hardjo C.T.G., present in 75% (30/40) of the reactions. It was concluded that antibodies against the investigated agents were detected, demonstrating the need to make a more efficient sanitary control in the herd.

1 Introdução

O estado do Pará possui o maior rebanho bubalino do país, com 520 mil cabeças de acordo com a pesquisa agropecuária no ano 2016, o que representa cerca de 38% da produção nacional, dos quais a maioria são provenientes da Ilha do Marajó, com 160 mil animais da espécie no estado. A criação de búfalos é de grande importância para a ilha, pois além de fornecerem carne, leite, couro e chifres, estes animais são utilizados pela polícia para a patrulha no município de Soure, além de ser comum a criação desses animais no quintal das casas dos moradores do arquipélago (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017).

A criação de búfalos na ilha apresenta peculiaridades quando comparados aos demais rebanhos brasileiros, sendo em sua totalidade extensiva e sem uso de cercas, o que dificulta o manejo e controle sanitário dos animais (Barbosa, 2005), principalmente de enfermidades preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Dentre estas enfermidades, o Mapa no uso de suas atribuições estabeleceu o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) que visa controlar a infecção por agentes de enfermidades zoonóticas, como *Brucella* sp., em bovinos e bubalinos no território nacional de acordo com a Instrução Normativa SDA nº 10, de 3 de março de 2017 (Brasil, 2017).

Diferente da Brucelose, que possui um programa sanitário oficial, a Leptospirose não possui nenhum programa nacional de controle voltado para os animais, restringindo-se a notificação obrigatória de casos suspeitos ao serviço veterinário oficial conforme Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013 (Brasil, 2013). Desta maneira é bem provável que se tenha subnotificação de informação e prevalência deste agente nos rebanhos de bovídeos, o que dificulta o conhecimento do real *status* sanitário da enfermidade, principalmente na região Norte, onde poucos estudos são realizados.

No Pará os estudos de presença de anticorpos contra *Brucella* sp. em bubalinos ainda são insipientes, com frequência de anticorpos variando de 3,75% a 4,8 % (Silva et al., 2014a; Silva et al., 2014b; Viana et al., 2009). Em outros estados da federação a situação é semelhante, como em Minas Gerais, Paraíba e Maranhão, com prevalências distintas que variam entre 0 a 37,5% (Bastianetto et al., 2005; Brasil et al., 2015; Carvalho et al., 2015).

Estudos relacionadas a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em búfalos assintomáticos na região amazônica foram pouco relatados, como o de Viana et al. (2009) que encontraram uma alta frequência com 80% (164/205) dos animais reagentes. Em outros estados, como Paraíba, Pernambuco e Maranhão foram relatados bubalinos soros reagentes com frequências que variaram de 27,9% a 70,58% (Brasil et al., 2015; Carvalho et al., 2015; Oliveira et al., 2018).

Pesquisas sobre *Leptospira* spp. e *Brucella* sp. em búfalos ainda são escassas na região, diante disso é importante verificar a real situação sanitária de bubalinos que são abatidos no Pará. Por esse fato, este estudo teve como objetivo detectar a presença de anticorpos anti-*Brucella* sp. e anti-*Leptospira* spp. em amostras de soros de búfalos abatidos em matadouro frigorífico no município de Belém, estado do Pará.

2 Material e métodos

A realização da pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (Ceua/UFPA) sob o número de protocolo Ceua nº 7370150318. O trabalho foi realizado em um matadouro frigorífico sob inspeção estadual no município de Belém, que realiza abate de animais oriundos dos municípios de Soure, Cachoeira do Arari e Chaves, localizados na Ilha do Marajó, estado do Pará.

As amostras de sangue foram coletadas no momento em que ocorreu a sangria de 113 animais bubalinos abatidos, mediante prévia sensibilização dos animais. O volume de sangue coletado foi de aproximadamente 10 ml, obtidos diretamente da veia jugular em tubos de vidros tipo *vacutainer*[®] sem anticoagulante, identificados, armazenados em caixa isotérmicas e encaminhados para o laboratório, onde foram centrifugados para se ter retração do coágulo e obtenção do soro, que foram armazenados em microtubos de plástico de 2 ml do tipo *Eppendorf*[®], devidamente identificados e em seguida conservados a -200 C até o momento da realização das provas sorológicas, não havendo descongelamento e congelamento das amostras.

A pesquisa de anticorpos para *Brucella* sp. foi realizada com base nos testes oficiais conforme o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) Instrução Normativa SDA nº 10, de 3 de março de 2017 (Brasil, 2017) que consistiu de uma triagem inicial pela técnica de soroaglutinação rápida em Placa com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), corado pelo Rosa Bengala, nos quais os soros considerados reagentes foram submetidos à prova confirmatória de soroaglutinação lenta em tubo com 2-Mercaptoetanol (2-ME). Em cada teste foi incluído um soro conhecidamente positivo, um sabidamente negativo e ainda tubos contendo apenas antígeno para controle das provas.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi realizada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) utilizando como antígenos as culturas de cepas-padrão de 16 sorovares de *Leptospira* spp. (Bratislava, Castellonis, Canicola, Djasiman, Grippytyphosa, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Wolffii, Tarassovi, Hardjo, variantes do Hadjo – Hardjo bovis, Hardjo prajitno, Hardjo C.T.G., Hardjo miniswajizak) mantidos por repiques semanais em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) a 29 °C.

3 Resultados e Discussão

Das 113 amostras submetidas ao teste de triagem pela técnica de soroaglutinação rápida em placa 13,3% (15/113) foram reagentes e estas foram submetidas à prova confirmatória 2-ME como recomendado pelo PNCEBT, onde 6,2% (7/113) foram reagentes, demonstrando a importância da utilização de pelo menos duas técnicas sorológicas para se evitar resultados falso-positivos (Silva et al., 2014a). Supõe-se que a presença de animais reagentes para brucelose pode ser justificada pelo manejo de criação extensiva sem uso de cercas, muito comum na Ilha do Marajó, o que dificulta o controle sanitário do rebanho, predispondo os animais a entrarem em contato com fômites e reservatórios de agentes como a *Brucella* sp.

No Brasil, diferentes prevalências foram relatadas variando de 0 a 37,5% em diferentes rebanhos bubalinos nos estados

de Minas Gerais, Paraíba e Maranhão utilizando o teste 2-ME (Bastianetto et al., 2005; Brasil et al., 2015; Carvalho et al., 2015), o que demonstra que apesar da implementação do programa de controle e erradicação da Brucelose, o agente ainda está circulando nas diversas áreas do território nacional e por isso, esforço não só dos órgãos públicos, mas também dos produtores rurais ainda devem ser tomados, para que o país continue crescendo na pecuária e ganhe cada vez mais espaço no mercado local e internacional.

No Pará, a prevalência oficial da Brucelose pelo PNCEBT ainda não foi finalizada, entretanto existem estudos que mostram a presença do agente neste estado, em especial na ilha onde se encontram o maior número de animais do estado do Pará, como o estudo de Silva et al. (2014a) observaram que 3,81% (183/4796) dos animais foram reagentes nos testes confirmatórios de fixação do complemento e 3,67% (176/4796) de 2-ME em búfalos de sete municípios da Ilha do Marajó. Silva et al. (2014b) em fêmeas bubalinas, gestantes e não grávidas em diferentes regiões do estado do Pará observaram que 4,8% (188/3.917) dos animais foram diagnosticados como reagentes pelo teste de triagem AAT e destes, 95,7% (180/188) foram confirmados pelo 2-ME.

Diferentes prevalências foram encontradas tanto em regiões próximas ao local de estudo (Silva et al., 2014b), como em outros estados brasileiros (Bastianetto et al., 2005; Brasil et al., 2015; Carvalho et al., 2015), demonstrando um potencial risco de transmissão do agente para os manipuladores das carcaças, principalmente se estes não se propuserem a utilizar corretamente os equipamentos de proteção individual (EPI).

Com relação à pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp., foram detectados 35,4% (40/113) de soro-reatores, com maior frequência para o sorovar Hadjo C.T.G. com 75% (30/40), seguido por Icterohaemorrhagiae e Djasiman com 5% (2/40) cada e Bratislava, Hadjo prajitno, Pyrogenes e Pomona com 2,5% (1/40), além disso 5% (2/40) das amostras apresentaram co-aglutinação para dois ou mais sorovares.

No Brasil diferentes frequências foram relatadas para a espécie bubalina, variando de 27,9% a 70,58% nos estados da Paraíba e Maranhão, com prevalência dos sorovares Bratislava, Pomona, Canicola, Butembo, Icterohaemorrhagie, Sentot, Copenhageni, Andamana, Castelonis, Wolfi, Panama, Grippytyphosa, Patoc, Hardjo, Castellonis, Djasiman e Tarassovi (Brasil et al., 2015; Carvalho et al., 2015).

No Pará, pesquisa realizada no nordeste do estado e na Ilha do Marajó demonstrou prevalência de 80% com reação para os sorovares Hardjo e wolffi (Viana et al., 2009) divergindo com este estudo com relação à frequência de animais reagentes, entretanto demonstrando concordância com os sorovares mais frequentemente encontrados, sugerindo assim uma tendência dos bubalinos da região se infectarem por bactérias pertencentes ao sorogrupo Serjoe, como as estirpes Wolffi e Hardjo e suas variantes.

Além disso, vale ressaltar que a criação de bubalinos apresenta um manejo sanitário com limitações, pois a maioria das propriedades na região da Ilha do Marajó não possuem cerca, permitindo a livre circulação dos animais, o que ocasiona o inadequado manejo do rebanho, refletindo em sua baixa sanidade. Outro fator determinante é que a região possui características climáticas com altos índices pluviométricos no

período do inverno amazônico (2300 a 5000mm/dezembro a maio), tornando dois terços da ilha alagados, dificultando desta maneira o controle sanitário para estes dois agentes e outras zoonoses (Barbosa, 2005; Lourenço Júnior e Garcia, 2008).

Outro fator a ser observado é que achados como estes dos bubalinos reagentes para *Leptospira* spp. ajudam a compreender melhor a cadeia epidemiológica do agente na espécie na região amazônica. Fato esse confirmado por Barragan et al. (2017), que avaliaram a eliminação de *Leptospira* pela urina de bovinos, suínos e roedores, comprovando que bovinos podem ser mais importantes para contaminação ambiental pela bactéria do que os próprios roedores, que são considerados os principais reservatórios do agente na natureza, uma vez que o volume urinário expelido pelos bovinos é maior do que estes animais. Essa afirmativa pode ser equiparada aos búfalos por apresentarem características epidemiológicas semelhantes aos bovinos (Barbosa, 2005).

A prevalência de *Leptospira* spp. e *Brucella* sp. encontradas na pesquisa e confrontada como os demais estudos ratifica a necessidade de tomadas de medidas para o controle e profilaxia da leptospirose e brucelose nos rebanhos bubalinos e bovinos, para que o consumidor possa ter em mesa proteína animal de qualidade.

Além disso, válida a necessidade do uso de EPI pelos profissionais que manipulam estes bubalinos desde a sua chegada ao frigorífico até todas as etapas de abate e processamento desta carne, pois são considerados grupos de risco e sua exposição direta com os fluidos naturais dos animais abatidos pode favorecer a infecção por agentes zoonóticos (Coelho et al., 2014).

4 Conclusão

A elevada presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. no rebanho bubalino proveniente da Ilha do Marajó, demonstrou a necessidade da adoção de um controle sanitário mais efetivo. Em contrapartida, apesar da reduzida prevalência de animais positivos à *Brucella* sp., o controle deve ser intensificado, já que a enfermidade faz parte do programa de erradicação do governo, com o intuito de eliminar a circulação dentro do território nacional.

Referências

- BARBOSA, N. G. S. Bubalinocultura no estado do Pará. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 29, n. 1, p. 34-38, 2005.
- BARRAGAN, V.; NIETO, N.; KEIM, P.; PEARSON, T. Meta-analysis to estimate the load of *Leptospira* excreted in urine: beyond rats as important sources of transmission in low-income rural communities. *BMC Research Notes*, New York, v. 10, n. 71, 2017.
- BASTIANETTO, E.; AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; OLIVEIRA, D. A. A.; LEITE, R. C. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco – Minas Gerais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 29, n. 21, p. 55-56, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 50 de 24 de setembro de 2013*. Altera as doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal. Brasília: Mapa, 2013.

- BRASIL, A. W. L.; PARENTONI, R. N.; COSTA, D. F.; PIMENTA, C. L. R. M.; ARAÚJO, R. P.; LEAL, A. B. G.; ALVES, C. A.; AZEVEDO, S. S. Occurrence of anti-*Brucella abortus* and anti-*Leptospira* spp. antibodies in buffaloes from Paraíba state, Northeastern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 36, n. 3, p. 2005-2012, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa SDA nº10 de 3 de março 2017*. Aprova regulamento técnico do PNCEBT. Brasília: Mapa, 2017.
- CARVALHO, O. S.; GONZAGA, L. N. R.; ALBUQUERQUE, A. S.; BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P. Occurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. *African Journal of Microbiology Research*, Lagos, v. 9, n. 9, p. 598-603, 2015.
- COELHO, E. L. M.; CHAVES, N. P. C.; SÁ, J. C.; MELO, S. A., SILVA, A. L. Prevalência de leptospirose em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos no município de São Luís, MA. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 111-115, 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Maior concentração de búfalos do país, Ilha do Marajó está no Censo Agro*. Rio de Janeiro, 13 nov. 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2vXJkQd>. Acesso em: 10 abr. 2018.
- LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; GARCIA, A. R. Panorama da bubalinocultura na Amazônia. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA, 1. 2008, Belém, PA. *Anais [...]*. Belém: Sebrae-PA, 2008.
- OLIVEIRA, P. R. F.; SOARES, L. B. F.; BORGES, J. M.; BARROSA, N. C.; LANGONI, H.; BRANDESPIM, D. F.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Occurrence of serological reactions for serogroup Sejroe (CTG and Prajino) in female buffalo in the state of Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, Rio de Janeiro, n. 10, p. 795-800, 2018.
- SILVA, J. B.; FONSECA, A. H.; BARBOSA, J. D. Serological survey of *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* and *Borrelia burgdorferi* in water buffaloes in the northern region of Brazil. *Revista de Salud Animal*, Havana, v. 36, n. 1, p. 35-39, 2014a.
- SILVA, J. B.; RANGEL, C. P.; FONSECA, A. H.; MORAIS, E.; VINHOTE, W. M. S.; LIMA, D. H. S. SILVA, N. S.; BARBOSA, J. D. Serological survey and risk factors for brucellosis in water buffaloes in the state of Pará, Brazil. *Tropical Animal and Health Production*, Edinburgh, v. 46, p. 385-389, 2014b.
- VIANA, R. B.; DEL FAVA, C.; MOURA, A. C. B.; CARDOSO, E. C.; ARAÚJO, C. V.; MONTEIRO, B. M.; PITUCO, E. M.; VASCONCELLOS, S. A. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na Amazônia. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 453-457, 2009.

Contribuição dos Autores: Todos os autores contribuíram para a concepção do trabalho; Katarine de Souza Rocha realizou a análise dos dados e escrita científica; Michele de Souza Lima realizou a coleta de amostras e análise de dados; Giselle Souza da Paz realizou submeteu as amostras aos testes laboratoriais para a pesquisa dos agentes propostos na pesquisa; Hélio Langoni realizou a revisão do manuscrito; Carla Cristina Guimarães de Moraes contribui com a elaboração do manuscrito, análise de dados e revisão crítica do conteúdo intelectual.

Agradecimentos: Aos funcionários do matadouro que permitiram a realização da pesquisa.

Fontes de Financiamento: Não houve fonte de financiamento.

Conflito de Interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.