

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
BRUCELOSE E LEPTOSPIROSE EM NÚCLEOS DE  
CONSERVAÇÃO DE GADO CURRALEIRO PÉ DURO E  
PANTANEIRO**

Alana Flávia Romani  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
BRUCELOSE E LEPTOSPIROSE EM NÚCLEOS DE  
CONSERVAÇÃO DE GADO CURRALEIRO PÉ DURO E  
PANTANEIRO**

Alana Flávia Romani  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA  
2012

ALANA FLÁVIA ROMANI

**INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
BRUCELOSE E LEPTOSPIROSE EM NÚCLEOS DE CONSERVAÇÃO  
DE GADO CURRALEIRO PÉ DURO E PANTANEIRO**

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor  
em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e  
Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

**Área de Concentração:**

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Clorinda Soares Fioravanti

**Comitê de Orientação:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria de Sá Jayme

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

GOIÂNIA  
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**BSCAJ/UFG**

R758i Romani, Alana Flávia.

Investigação soropidemiológica e molecular de brucelose e leptospirose em núcleos de conservação de gado Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro [manuscrito] / Alana Flávia Romani. - 2012.

92 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Clorinda Soares Fioravanti.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2012.

Bibliografia.

1. Bovino. 2. Leptospirose. 3. Brucelose. 4. Cerrado e Pantanal. I. Título.

CDU: 636.2

À minha mãe Maria Eterna pelo imenso amor e intercessão constante em suas orações

Ao Guilherme, meu marido e parceiro nessa caminhada, que adiou seus planos pessoais para realização desse projeto em comum

Às minhas filhas Letícia e Maria Luiza, motivos maiores de todo esforço, por encherem minha vida de alegria e amor e por despertarem em mim o desejo de ser uma pessoa melhor a cada dia

Dedico

## **Agradecimentos**

À Deus por tantas dádivas e bênçãos, mesmo diante da fé trêmula, da dúvida, do medo de falhar. Obrigada Senhor!

Ao Guilherme e às minhas filhas Letícia e Malu por tolerarem minha ausência e por fazerem parte de minha caminhada, fornecendo o combustível para uma vida feliz: AMOR.

Aos meus pais Maria Eterna e Eloi e demais familiares pela torcida, incentivo e apoio. Vocês são muito importantes para mim.

À minha orientadora, Maria Clorinda Soares Fioravanti, por ter aceitado e abraçado comigo esse desafio. Exemplo de amor e dedicação à profissão, pesquisadora e professora de excelência... Obrigada por ter dividido seu precioso tempo, construindo comigo este trabalho.

Aos professores que compuseram meu comitê de orientação: Guido Fontgalland Coelho Linhares e Valéria de Sá Jayme. Sempre solícitos e presentes, seus ensinamentos e esclarecimentos foram fundamentais para execução desse trabalho e para minha formação. Ao Emmanuel Arnhold pela imensa ajuda nas análises estatísticas.

Às amigas e colegas de profissão Maria Ivete de Moura, Sabrina Castilho Duarte e Thaís Miranda Silva Freitas e à técnica do laboratório de leptospirose da EVZ – UFG Maria de Lurdes da Luz Carvalho, que nunca mediram esforços e sempre estiveram dispostas a me ajudar, dividiram comigo conhecimentos e lições de otimismo e demonstraram que são pessoas realmente especiais.

Aos colegas, professores do curso de medicina veterinária do Campus Jataí - UFG, em especial às amigas Cecília Nunes Moreira e Andréia Vitor Couto do Amaral e ao Rogério Elias Rabelo pelo apoio e incentivo durante meu afastamento.

Ao CNPq pelo suporte financeiro e aos pesquisadores, alunos de graduação e pós-graduação que compõem o grupo de pesquisa da Rede Centro-

Oeste, em especial à Dra. Raquel Soares Juliano da Embrapa Pantanal, pela colheita de material e dados que tornaram este trabalho possível.

À Embrapa Gado de Corte, sobretudo à pesquisadora Dra. Grácia Maria Soares Rosinha, pelo apoio e orientações para realização do diagnóstico molecular nesta instituição.

A todos os educadores e funcionários da Creche da UFG, que fizeram parte dessa fase tão importante da vida de minhas filhas, cuidando das mesmas com carinho, responsabilidade e profissionalismo.

Às minhas alunas Alana Lucena e Juliana Ferreira Batista, pelo auxílio no término da tese.

Às minhas amigas de sempre, longe ou perto sei que torceram por mim... comadre Adriana Campos, Mariana Brito Lobo, Éllen Deniz e Claudia Peixoto.

À Universidade Federal de Goiás, em especial à Pós-Graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia por ter me concedido a oportunidade para realização desse curso.

***Meus sinceros agradecimentos***

*“Necessitamos uns dos outros para  
sermos nós mesmos”  
Santo Agostinho*

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Estado da arte.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Raças brasileiras bovinas locais .....	2
1.2.2 Programas sanitários .....	8
1.2.3 Brucelose.....	9
1.2.4 Leptospirose .....	16
<b>1.3 Justificativa .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4 Objetivos.....</b>	<b>24</b>
Referências.....	26
<b>CAPÍTULO 2 – FREQUÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À BRUCELOSE E À LEPTOSPIROSE EM BOVINOS CURRALEIROS PÉ DURO E PANTANEIROS NO CERRADO E PANTANAL.....</b>	<b>35</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>37</b>
<b>2 Material e métodos.....</b>	<b>39</b>
2.1 Área de estudo .....	39
2.2 Colheita, remessa e armazenamento de amostras .....	40
2.3 Avaliações laboratoriais .....	41
2.4 Determinação dos fatores associados para brucelose e leptospirose .....	42
2.5 Análise estatística.....	43
<b>3 Resultados.....</b>	<b>43</b>
<b>4 Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>5 Conclusões.....</b>	<b>62</b>
Referências.....	63
<b>CAPÍTULO 3 – TESTES SOROLÓGICOS E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NA IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÕES POR <i>Brucella</i> spp. E <i>Leptospira</i> spp. EM BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ DURO .....</b>	<b>69</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>71</b>
<b>2 Material e métodos.....</b>	<b>73</b>
2.1 Amostras .....	73
2.2 Técnicas sorológicas .....	74
2.3 Extração de DNA total .....	75
2.4 Amplificação dos genes pela PCR .....	76
<b>3 Resultados.....</b>	<b>78</b>
<b>4 Discussão .....</b>	<b>79</b>
<b>5 Conclusão.....</b>	<b>81</b>
Referências.....	82
<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Origem das amostras de soro de bovino das raças Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro, submetidas à sorologia para determinação da prevalência de brucelose e leptospirose.....	41
TABELA 2 – Frequência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. no teste de SAM em 1.280 amostras de soro bovino da raça Curraleiro Pé Duro de 20 propriedades nos Estados do Piauí, Goiás e Tocantins.....	45
TABELA 3 – Frequência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. no teste de SAM em 248 amostras de soro bovino da raça Pantaneiro de quatro propriedades nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.....	45
TABELA 4 – Frequência de reações positivas por sorovar de <i>Leptospira</i> spp. no teste de SAM em 573 amostras de soro de bovinos Curraleiros Pé Duro e Pantaneiros de 24 propriedades.....	46
TABELA 5 – Frequência de títulos de anticorpos anti- <i>Leptospira interrogans</i> para os principais sorovares no teste de SAM em bovinos Curraleiros Pé Duro e Pantaneiros	48
TABELA 6 – Frequência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. no teste de SAM em bovinos das raças Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro de acordo com a faixa etária	49
TABELA 7 - Frequência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. no teste de SAM em bovinos das raças Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro de acordo com o sexo.....	49
TABELA 8 - Resultado da análise univariada dos possíveis fatores associados à leptospirose, em rebanhos de bovinos Curraleiros Pé Duro, para variáveis relacionadas aos animais e aos rebanhos dos quais fazem parte ( $p < 0,20$ ).....	50
TABELA 9 – Modelo final da regressão logística multivariada de fatores de risco ( <i>odds ratio</i> ) para leptospirose em Curraleiros Pé Duro.....	50
TABELA 10 - Resultado da análise univariada dos fatores associados à leptospirose, em rebanhos de bovinos Pantaneiros, para variáveis relacionadas aos animais e aos rebanhos dos quais fazem parte ( $p < 0,20$ ).....	51
TABELA 11 – Modelo final da regressão logística multivariada de fatores de risco ( <i>odds ratio</i> ) para leptospirose em Pantaneiros.....	51

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Resultados do teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) e do teste do antígeno acidificado tamponado com confirmação pela combinação de soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol (AAT + (SAL+2-ME)) para detecção da infecção por <i>Brucella</i> spp em bovinos da raça Curraleiro Pé Duro.....	78
TABELA 2 - Resultados do teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) e do teste de soroaglutinação microscópica (SAM) para detecção da infecção por <i>Leptospira</i> spp em bovinos da raça Curraleiro Pé Duro.....	78

## RESUMO

As raças bovinas localmente adaptadas aos diferentes ecossistemas brasileiros caracterizam-se como uma alternativa para produção de alimentos, por apresentarem entre outras características, maior resistência a enfermidades. O objetivo geral foi avaliar a situação epidemiológica da brucelose e da leptospirose em núcleos de conservação de bovinos Curraleiros Pé Duro e Pantaneiros no Cerrado e Pantanal, utilizando métodos sorológicos e moleculares no diagnóstico de rebanho destas enfermidades. Foram testados soros de 1.280 bovinos Curraleiros e 248 bovinos Pantaneiros em amostragem de conveniência. Para diagnóstico de leptospirose empregou-se a soroaglutinação microscópica (SAM) e para brucelose adotou-se o teste de antígeno acidificado tamponado (AAT) e confirmação pelo teste de soroaglutinação lenta e 2 mercaptoetanol (2 - ME). Além dos métodos sorológicos descritos, foi empregada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de infecção por *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em bovinos Curraleiros Pé Duro, para avaliar a concordância dos resultados de tais testes. A frequência de brucelose em bovinos Curraleiros foi de 0,7% para animais e 25% para rebanhos, enquanto os Pantaneiros foram soronegativos para *Brucella abortus*. A frequência anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos Curraleiros foi de 44,8% e em Pantaneiros 51,2%. 100% dos rebanhos apresentaram animais soropositivos. Os fatores associados à leptospirose em bovinos Curraleiros foram acesso à área alagadiça, ocorrência de abortos, vacinação contra leptospirose e prática de abate na propriedade. Para bovinos Pantaneiros os fatores associados foram sexo e idade, com maior risco para fêmeas na faixa etária entre 12 e 24 meses. Conclui-se que a brucelose apresenta baixa frequência em bovinos Curraleiros Pé Duro e está controlada em Pantaneiros. A leptospirose revelou-se amplamente disseminada nos núcleos de criação de bovinos de raças localmente adaptadas. Nas duas raças os sorovares mais prevalentes foram Hardjo e Wolffi reforçando o papel dos bovinos como fonte de infecção no rebanho. A ocorrência de positividade para sorovares adaptados à fauna silvestre local sugere a participação da mesma na epidemiologia da leptospirose bovina nos núcleos de conservação das raças. A concordância dos resultados obtidos pela PCR em amostras sanguíneas e pela sorologia para identificação da infecção por *Brucella*

spp. e *Leptospira* spp. foi fraca, o que reforça da necessidade de validação da PCR tendo em vista que o diagnóstico é mais confiável quando obtido por meio de vários métodos.

Palavras-chave: Cerrado, diagnóstico, Pantanal, raças bovinas locais, zoonoses

## SEROEPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR MONITORING OF BRUCELLOSIS AND LEPTOSPIROSIS IN NUCLEUS OF IN SITU CONSERVATION OF CURRALEIRO “PÉ-DURO” AND PANTANEIRO BREEDS

### Abstract

The locally adapted breeds to different Brazilian ecosystems characterized as an alternative to food production, for presenting, among other characteristics, greater resistance to diseases. The main objective of this study was to evaluate the epidemiological situation of brucellosis and leptospirosis in nucleus of in situ conservation of Curraleiro and Pantaneiro bovine breeds in Cerrado and Pantanal biomes by serological and molecular diagnosis of these diseases in the livestock. We analyzed serum of 1,280 Curraleiro and 248 Pantaneiro animals on convenience sampling. We employed microscopic agglutination test, for the diagnosis of leptospirosis and the buffered acidified antigen test (Rose Bengal plate test) for brucellosis and 2-mercaptoethanol test for confirmation. The frequency of brucellosis in Curraleiro was 0.7% for animals and 25% for herds. In Pantaneiros, all animals tested were negative for *Brucella abortus*. The frequency of anti-*Leptospira* antibodies was 44.8% in Curraleiro and 51.2% in Pantaneiros, and 100% of the herds of both breeds showed positive animals. The factors associated with leptospirosis were access to wetland, abortions, vaccination against leptospirosis and practice of slaughtering in the property for Curraleiro breed; and sex and age, with the highest risk for females aged between 12 and 24 months for Pantaneiro breed. Serological methods were employed above and polymerase chain reaction (PCR) for detecting infection by *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. in cattle, to evaluate the concordance of the results of such tests. Brucellosis shows low frequency in Curraleiro cattle and is controlled in Pantaneiro. Leptospirosis was widely disseminated in nucleus of in situ conservation. In both breeds the serovars Hardjo and Wolffi were the most prevalent, which reinforce the function of bovine as a source of infection in the herd. However, the presence of reactions to serovars characteristic of wild animals suggests the involvement of local wildlife in the epidemiology of bovine leptospirosis in these nuclei of in situ conservation. The correlation of results obtained by serology and PCR to identify infection by *Brucella*

spp. and *Leptospira* spp. was weak, which reinforces the idea that the diagnosis is more reliable when more than one method is employed.

Keywords: Cerrado, diagnosis, local bovine breeds, Pantanal, zoonosis

## **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1.1 Introdução**

Vários processos sociais e ecológicos atuais têm favorecido a emergência e reemergência de doenças infecciosas com epidemiologia complexa. No Brasil, impactos negativos de atividades econômicas mal gerenciadas, em biomas como Cerrado e Pantanal são evidentes. Diante dessa perspectiva, é sabido que a exposição a patógenos tem aumentado, principalmente em decorrência de maior contato entre seres humanos e rebanhos de animais domésticos e silvestres que habitam esses nichos ecológicos.

O reconhecimento e a valorização da inter-relação entre a saúde animal e a humana têm estimulado a atuação conjunta de várias instituições no gerenciamento da saúde global. Profissionais de diferentes áreas têm desenvolvido estudos relacionados aos sistemas de vigilância de zoonoses e saúde pública para controle de patógenos, antes que estes afetem a saúde humana, os suprimentos de alimentos, a economia mundial e a biodiversidade.

Na tentativa de minimizar o impacto de ações antrópicas, como a pecuária, tem-se buscado alternativas para o desenvolvimento sustentável desta atividade. Nesse contexto, a opção pela criação de raças bovinas localmente adaptadas aos diferentes ecossistemas brasileiros, surgiu como alternativa para geração de alimentos e renda, além de serem considerados mais resistentes a enfermidades. Contudo, diante pressão de seleção em busca de maior produtividade, bovinos de raças locais foram cruzadas com linhagens exóticas a ponto de encontrarem-se quase totalmente absorvidas. Atualmente, quatro das cinco raças bovinas locais existentes no Brasil estão sob risco de extinção.

Estudos ecológicos permitem a identificação de regiões sob maior risco em relação à média global, seja no campo de análises exploratórias, mapeando doenças, seja na busca por modelos explicativos, identificando diferenciais de risco e apontando medidas preventivas. Assim, a execução de pesquisas na área de sanidade está entre as estratégias que podem ser empregadas para melhorar o desempenho reprodutivo e qualidade do material genético a ser preservado. A

geração de dados epidemiológicos norteia o desenvolvimento de medidas de controle, a fim de minimizar os impactos de enfermidades na preservação das raças adaptadas. É nesse contexto que esse estudo se insere, ao buscar determinar e analisar fatores relacionados à ocorrência de doenças como brucelose e leptospirose em bovinos de raças localmente adaptada: Curraleiros e Pantaneiros.

## **1.2 Estado da arte**

### **1.2.1 Raças brasileiras bovinas locais**

A domesticação dos animais iniciou-se há cerca de 12.000 anos, período no qual diversas subpopulações evoluíram, em decorrência da adaptação exigida pela migração do homem ao longo dos séculos. Estes animais sofriam pressão de seleção pelas condições climáticas, parasitas, doenças, disponibilidade variável de alimentos e outros critérios definidos pelo homem (MARIANTE et al., 2008). Os produtores controlavam a reprodução de maneira sustentável, pois utilizavam os indivíduos com os melhores fenótipos, permitindo o fluxo gênico e prevenindo a deriva genética em nível regional. Como resultado, bovinos, ovinos e caprinos adaptaram-se ao ambiente local, suprimindo as necessidades das populações locais (TABERLET et al., 2011).

Contudo, a introdução do conceito de raça mudou drasticamente a situação. A pressão de seleção sobre as populações locais foi intensificada, seguindo-se a padronização das características morfológicas e do desempenho dos animais. Apesar de ter propiciado o aumento na produtividade, a eficiência dos métodos modernos de seleção, conduziu a uma diminuição dramática na variabilidade genética. A pressão econômica sobre os pecuaristas os levou a abandonar a exploração de raças locais tradicionais, culminando com a extinção de algumas delas. Tal fato indica que os recursos genéticos animais estão seriamente ameaçados, sendo necessária a implementação de medidas que promovam a gestão sustentável dos recursos genéticos (TABERLET et al., 2011).

Esta constatação fez com que importantes instituições mundiais, como a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) buscassem mobilização para gestão racional dos recursos genéticos animais. Partindo da premissa de que o uso e a conservação dos recursos genéticos são inseparáveis, iniciou-se em 1991 um levantamento sobre a situação das principais espécies de animais domésticos. Desde então, programas mundiais de conservação têm buscado evitar a perda da diversidade genética causada pela extinção de raças e populações (EGITO et al., 2002).

Baseando-se em relatórios nacionais apresentados por 169 países, cujo conteúdo trazia uma análise do estado da biodiversidade no setor pecuário, a FAO (2007) publicou documento sobre o estado mundial dos recursos genéticos animais para alimentação e agricultura, constituindo a primeira avaliação global sobre o tema. No mesmo ano, a comunidade internacional adotou o primeiro Plano de Ação Mundial para os Recursos Genéticos Animais, que compreendia estratégias destinadas a combater a erosão da diversidade genética animal utilizando, de forma sustentável os recursos genéticos animais. O citado plano foi adotado por 109 países, incluindo o Brasil, durante a Conferência Técnica Internacional sobre Recursos Genéticos Animais, realizada na Suíça. Esse evento culminou com a adoção da Declaração de Interlaken, por meio da qual os países signatários confirmaram suas responsabilidades comuns e individuais pela conservação, assim como pelo uso sustentável e desenvolvimento dos recursos genéticos animais para a alimentação e a agricultura (FAO/Embrapa, 2010).

Na América Latina, os bovinos de raça local ou crioula foram a base da pecuária durante quase cinco séculos. No Brasil, diversas raças se desenvolveram a partir de animais trazidos pelos colonizadores. Estas se adaptaram às condições encontradas nas regiões do País, adquirindo características únicas como rusticidade, prolificidade e, provavelmente, resistência a parasitas e doenças encontradas nas diversas regiões brasileiras. Na busca de melhoria na produtividade, algumas populações locais foram sendo cruzadas com linhagens exóticas, sem o devido planejamento sistemático de melhoramento, a ponto de encontrarem-se quase totalmente absorvidas. Este modelo produtivo, que ainda persiste em muitas regiões, tem levado à diminuição e ao desaparecimento de algumas raças locais. Atualmente, dentre as cinco raças

bovinas localmente adaptadas existentes no Brasil, quatro encontram-se em risco de extinção. O gado Curraleiro e Pantaneiro estão entre elas (FIORAVANTI et al., 2011).

Para que este importante material genético não fosse perdido, em 1983, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) incluiu a conservação dos recursos genéticos animais em seu programa de conservação. A conservação vem sendo realizada por diversos centros de pesquisa da Embrapa, universidades, empresas estaduais de pesquisa, bem como por criadores particulares (EGITO et al., 2002; MARIANTE et al., 2008).

Não se sabe concretamente a origem dos bovinos trazidos à América pelos conquistadores. Acredita-se que os bovinos ibéricos sejam os ancestrais dos bovinos crioulos e sua dispersão pelas diversas regiões brasileiras tenha determinado um processo de seleção natural em diferentes populações que se adaptaram às circunstâncias locais (PRIMO, 1992). Para CARVALHO & GIRÃO (1999), o gado conhecido em alguns estados como Pé-duro (PiauÍ e Maranhão) ou Curraleiro (Goiás e Tocantins), seriam descendentes da raça Mirandesa, mais particularmente da variedade Beiroa, presente em Portugal e na província espanhola de Leon. Porém, é provável que tenham vindo de diferentes grupos genéticos, que na época ainda não eram estabelecidos como raça. Esses bovinos adequaram-se gradativamente às pastagens de baixa qualidade, às condições de baixa umidade, ao calor e outros fatores adversos. O resultado dessa seleção natural foi à sobrevivência de animais muito resistentes e adaptados a condições desfavoráveis dos trópicos.

A raça Curraleiro Pé Duro está presente nos Estados de Goiás, Bahia, Maranhão, PiauÍ, Pará e Tocantins. Para evitar seu desaparecimento, em 1997, apoiado pela Embrapa, foi criada e registrada no Ministério da Agricultura e Abastecimento, a Associação Brasileira de Criadores do Gado Curraleiro – ABCGC, sediada em Mara Rosa, Goiás, com finalidade de representação e defesa de criadores (SERRANO, 2001). No último censo de bovinos Curraleiros verificou-se um efetivo populacional de 3.692 animais, número considerado baixo, tornando a raça vulnerável à extinção. O sistema de produção empregado nestas propriedades se caracterizou pelo nível médio de tecnologia, com baixos custos

de produção, pouco retorno econômico e risco de endogamia (FIORAVANTI et al., 2011).

Na tentativa de minimizar o impacto de ações antrópicas, como a pecuária, tem-se buscado alternativas para o desenvolvimento sustentável e geração de renda que atinjam principalmente as populações próximas às áreas de preservação. Neste contexto foi elaborado um projeto que visasse maior conhecimento sobre as raças naturalizadas que fazem parte deste modelo de sustentabilidade. Assim, foi proposto um estudo intitulado “Gado Curraleiro: uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do Cerrado”, com o envolvimento de pesquisadores e alunos de diferentes instituições de ensino e pesquisa: Universidade Federal de Goiás (UFG), Universidade de Brasília (UnB), UNESP/Jaboticabal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e ainda do Doutorado Interinstitucional da UFG e Universidade Federal do Tocantins (UFT) (SANTIN, 2008).

Em 2006 a Universidade Federal de Goiás foi convidada pelo Ministério da Integração Nacional a esboçar um projeto que reintroduzisse o Gado Curraleiro nas comunidades quilombolas Kalungas. Desta parceria nasceu o projeto “Estabelecimento e Manutenção de Núcleos de Criação de Gado Curraleiro”, que permitiu a execução das atividades iniciais de estabelecimento do Núcleo de Criação de Gado Curraleiro no Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, que contou com o apoio da Prefeitura Municipal de Cavalcante, da Associação Kalunga de Cavalcante (AKC) e da Associação do Quilombo Kalunga (AQK). A principal meta do projeto foi valorizar os modos de vida da comunidade Kalunga e contribuir para preservação do cerrado e conservação de um importante recurso genético brasileiro, a raça bovina local Curraleiro. A criação de uma raça bovina local, de forma extensiva, alimentada com vegetação nativa, adaptada às condições do Cerrado, torna-se ideal para sistemas de produção agroecológicos em decorrência de sua resistência natural a patógenos. E ainda apresenta a vantagem de possuir sabor diferenciado em sua carne, o que pode ser utilizado como uma alternativa viável de geração de renda para a comunidade quilombola Kalunga, que vive em condições de extrema dificuldade, com nítido declínio das atividades agropecuárias e, portanto, de comercialização de produtos (NEIVA et al., 2011).

Dentre as raças brasileiras locais, destaca-se também o bovino Pantaneiro, também denominado Tucura ou Cuiabano, que representa hoje muitas gerações de adaptação e seleção natural às condições ecológicas do Pantanal. A raça desempenhou um papel importante na economia das áreas inundáveis do Pantanal Mato-Grossense no início do século XX. Dentre as mais citadas características de adaptação adquiridas pelo gado Pantaneiro, está a grande rusticidade, destacando-se a resistência à escassez de alimentos e a doenças. Estes animais são descendentes de raças espanholas, introduzidas na América durante a colonização da Bacia do Prata no século XVI. A influência de raças portuguesas na formação do bovino Pantaneiro ocorreu mais tarde, durante o século XVIII, quando alguns descendentes de animais já adaptados em Minas Gerais e Goiás foram introduzidos no Pantanal (MAZZA et al., 1992).

O gado Pantaneiro encontra-se ameaçado de extinção, tendo em vista o número reduzido de animais nos Núcleos de conservação conhecidos (JULIANO, et al., 2011). A Embrapa conta com plano de ação específico para o Núcleo de Conservação de Bovinos Pantaneiros, inserido na Plataforma de pesquisa de recursos genéticos animais. Dentre os objetivos específicos está a caracterização do estado sanitário dos núcleos de criação dos bovinos Pantaneiros e dos animais selvagens resgatados. Segundo a curadora da raça, atualmente existem quatro Núcleos de Conservação desta raça, localizados no município de Poconé no Mato Grosso e nos municípios de Corumbá, Aquidauana e Rochedo no Mato Grosso do Sul.

Considerando os projetos em parceria, já desenvolvidos ou em desenvolvimento, em 2011 foi instituída a Rede Pró-Centro Oeste para caracterização, conservação e uso das raças bovinas locais brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro. Neste projeto o objetivo geral é estabelecer uma rede inter-regional e interdisciplinar de pesquisas e transferência de conhecimento, com a finalidade de caracterizar tais raças em risco de extinção e de gerar dados para subsidiar o desenvolvimento de um modelo de exploração pecuária para o Cerrado e Pantanal, com a utilização desses bovinos. As ações buscam priorizar a conservação dos referidos ecossistemas, a sustentabilidade e a diversidade genética. Fazem parte da Rede, entre outros, sete universidades, centros da Embrapa e associações.

A preservação das raças brasileiras bovinas locais, das quais o Curraleiro e o Pantaneiro fazem parte, tem seu aspecto histórico, pois constituem a “memória genética” de animais que participaram da colonização do País. Em decorrência de seu genótipo compatível com condições adversas, essas foram capazes de superar, após dezenas de gerações de seleção natural, os desafios ambientais aos quais foram submetidas (MARIANTE et al., 2008).

Dentre os objetivos de programas de conservação *in situ* de populações animais, está o aumento do número de indivíduos, garantindo a variabilidade genética da espécie envolvida. Para tanto, devem ser utilizadas técnicas de manejo destinadas a maior circulação dos animais entre os criatórios, estimuladas a abertura de novos núcleos de criação e aplicadas biotecnologias destinadas a maximizar a eficiência reprodutiva da população. Tais procedimentos, contudo, podem aumentar as chances de disseminação de doenças. Assim, o conhecimento da situação sanitária de um rebanho é imprescindível para criação de estratégias para prevenção e controle de enfermidades dentro e dentre os núcleos de criação envolvidos no programa de conservação (JULIANO, 2006).

Diante do risco de problemas sanitários, é importante salientar que doenças da esfera reprodutiva têm efeitos deletérios comprovados aos índices de fertilidade dos rebanhos e podem ter efeito catastrófico em pequenas populações de raças ameaçadas, levando à extinção. Por isso, são recomendadas investigações periódicas de enfermidades como brucelose, leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia bovina a vírus, dentre outras, visando garantir o desempenho reprodutivo das fêmeas e a qualidade do próprio material genético a ser preservado (PELLEGRIN et al., 1997).

Para CARDELLINO & BOYAZOGLU (2009) programas de melhoramento de raças locais em países em desenvolvimento constituem-se em um desafio. Dentre as prioridades de pesquisa na área de recursos genéticos, os autores destacaram a seleção para resistência a doenças na criação de animais, se genes específicos forem identificados. Segundo JULIANO (2006) antes de iniciar projetos de conservação, é necessário a geração de conhecimentos sobre a espécie animal escolhida, atentando para as condições fisiológicas desta população, todos os seus aspectos epidemiológicos e sanitários, para obter

subsídios que justifiquem sua introdução em um ecossistema, sem colocar em risco os demais componentes desta população.

### 1.2.2 Programas sanitários

Um programa de saúde animal é definido pelo conjunto de ações veterinárias regulares e bom manejo do rebanho com a finalidade primária de manter a saúde e produção animal em níveis ótimos. Nesses programas, são desempenhadas ações de controle e erradicação de doenças por meio de medidas de defesa sanitária com foco na biossegurança (FAVA et al., 2003).

Dentre as informações necessárias para tomada de decisões em um programa de manejo sanitário destacam-se ações de monitoramento e investigação, com diagnóstico laboratorial de doenças subclínicas. Qualquer programa de saúde animal obrigatoriamente deve incluir a vigilância de doenças infecciosas específicas como a brucelose, leucose, diarreia viral bovina, leptospirose e tuberculose. Essa vigilância tem como objetivo primário identificar os portadores para então efetivar a sua eliminação do rebanho (RADOSTITIS, 2001).

Apesar de tratar-se de uma antropozoonose conhecida desde épocas remotas, a brucelose ainda é um dos principais problemas sanitários do rebanho bovino brasileiro. Em 2001, foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2006).

De acordo com ARAÚJO et al. (2005), no Brasil a leptospirose bovina, além de não ser doença de notificação compulsória, não está submetida ao combate organizado por órgãos e entidades públicas ou privadas de sanidade animal, o que dificulta conhecer a verdadeira extensão das infecções por *Leptospira* spp. nos rebanhos bovinos em qualquer região do País. Para MARQUES (2010) a determinação da taxa de prevalência é essencial para a quantificação do problema em termos populacionais, servindo de base para

caracterizações epidemiológicas, uma vez que o diagnóstico amplo, rápido e preciso das enfermidades é fundamental para elaboração de alternativas viáveis de intervenção.

### 1.2.3 Brucelose

A brucelose consiste em enfermidade de grande importância econômica em animais de produção em todo o mundo. O agente causador *Brucella* spp. provoca aborto e infertilidade em seus hospedeiros naturais, além de constituir-se em zoonose severa e debilitante (GODFROID et al., 2011). O impacto da doença não é notado somente pelas perdas na atividade pecuária. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) considera a enfermidade como de importância sócio-econômica, pois causa prejuízos ao tornar produtos de origem animal vulneráveis as barreiras sanitárias, comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (BRASIL, 2006). Em virtude dos avanços relevantes na biotecnologia, alguns países tiveram sucesso na erradicação da enfermidade, contudo em nações em desenvolvimento a doença ainda representa grande impacto na saúde pública (CUTLER et al., 2005).

Os organismos causadores são bactérias Gram-negativas intracelulares facultativas que podem acometer grande quantidade de mamíferos como homem, bovinos, ovinos, caprinos, roedores e mamíferos marinhos (CUTLER et al., 2005). Até 1985 o gênero *Brucella* consistia de seis espécies, conhecidas como clássicas: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae* e *Brucella canis*. A partir de 2007, *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis* foram reconhecidas como novas espécies. Em 2008, outras duas espécies foram isoladas: *Brucella microti*, de ratazana comum e *Brucella inopinata*, de uma prótese mamária de silicone em uma mulher idosa com sinais clínicos de brucelose (GODFROID et al., 2011).

Por tratar-se de hospedeiro intracelular facultativo, *Brucella* spp. infecta, multiplica-se e persiste no interior de macrófagos, interferindo em sua maturação e no processamento de antígenos, prejudicando a resposta imune do hospedeiro. Estes microrganismos possuem habilidade de infectar células

epiteliais, fagócitos, tecido respiratório, neurônios, tecidos do trato reprodutivo de machos e fêmeas, entre outros. A *Brucella* spp. é capaz de realizar finos ajustes no metabolismo celular de acordo com a fase do ciclo infeccioso, revelando enorme variedade de interações patogênicas com o hospedeiro (CUTLER et al., 2005; GODFROID et al., 2011).

No animal infectado, as localizações de maior frequência do agente são: linfonodos, baço, fígado, aparelho reprodutor masculino, útero e úbere. As vias de eliminação são representadas pelos fluidos e anexos fetais, eliminados no parto ou no abortamento e durante todo o puerpério, além de leite e sêmen. A principal fonte de infecção é representada pela vaca prenhe, que elimina grandes quantidades do agente por ocasião do aborto ou parto e em todo o período puerperal, contaminando pastagens, água, alimentos e fômites (RADOSTITIS et al., 2002). Essas bactérias podem permanecer viáveis no meio ambiente por longos períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, ampliando de forma significativa a chance de o agente entrar em contato e infectar um novo indivíduo suscetível (CUTLER et al., 2005).

Segundo OIE (2009) a brucelose bovina é causada principalmente pela *B. abortus*, menos frequentemente pela *B. melitensis* e ocasionalmente pela *B. suis*. Estas três espécies apresentam alta patogenicidade para humanos e, portanto, todos os tecidos infectados e materiais contaminados devem ser manipulados sob condições apropriadas.

O biovar 1 de *B. abortus* é universal e predominante entre os sete encontrados no mundo, assim é considerado o de maior importância epidemiológica na infecção de bovinos. Quando a brucelose atinge um rebanho livre, a infecção se difunde com grande rapidez, gerando muitas perdas. Depois de aproximadamente dois anos o número de abortos diminui, bem como a suscetibilidade da população à infecção. Em rebanhos grandes sempre há número suficiente de susceptíveis que mantêm os abortos podendo ocasionar um segundo surto. O comércio e trânsito de bovinos também contribuem para manter a infecção de forma ativa (ACHA & SZYFRES, 2001).

As vacas constituem a categoria mais suscetível à brucelose, principalmente aquelas em gestação. Os touros também são suscetíveis, porém são mais resistentes que as fêmeas. Além da idade e do sexo, existe variação de

suscetibilidade individual, pois existem animais que não são acometidos, mesmo em rebanhos com elevada taxa de prevalência (ACHA & SZYFRES, 2001).

Quando se pretende iniciar um programa de controle de brucelose bovina, é de extrema importância conhecer a situação epidemiológica da doença, para permitir a escolha das melhores estratégias e o acompanhamento do programa com vistas a possíveis correções, para evitar desperdício de tempo e de recursos (POESTER et al., 2009). GODFROID et al. (2011) afirmaram que a epidemiologia da brucelose em rebanhos tem sido frequentemente descrita em países em desenvolvimento, nos últimos dez anos. As estimativas de soroprevalência em bovinos têm variado entre 3% e 15%.

Em estudo realizado na Etiópia, JERGEFA et al. (2009) encontraram como fatores de risco para brucelose a raça do rebanho e a disposição inadequada de material de aborto. A prevalência revelou-se maior em animais cruzados do que naqueles de raças locais, bem como naqueles mantidos em condições de manejo intensivo em comparação com semi-intensivo ou extensivo. A prevalência geral detectada pelos autores foi de 2,9% para animais e 13,6% para rebanhos.

Dentre as ações desenvolvidas no PNCEBT, por meio de um termo de cooperação técnica entre o MAPA e Universidades Federais, destacam-se estudos de soroprevalência da brucelose em 15 unidades federativas (UF) (POESTER et al., 2009). Em Goiás, ROCHA et al. (2009) detectaram índices de 17,5% para propriedades e de 3,0% para animais.

No estado do Mato Grosso do Sul, os estudos revelaram prevalência de 41,5% de rebanhos infectados. Nesta UF foi feito o cálculo da soroprevalência por estratos. Considerando focos e animais infectados obtiveram-se respectivamente, 59% e 12% para o estrato Pantanal-corte e 40,6% e 4,5% para Planalto-corte. No estrato Planalto-leite a prevalência de focos foi de 33,1% (CHATE et al., 2009).

Ao analisar os aspectos sanitários de bovinos Curraleiros, JULIANO (2006) testou amostras de soro de 569 animais de diferentes propriedades, sendo detectada prevalência de 1,23% para brucelose. A taxa de positividade observada, associada ao manejo adotado e a vacinação sistemática dos animais podem ter favorecido o baixo índice da enfermidade nos rebanhos. SANTIN

(2008) testou soro de 116 fêmeas curraleiras e obteve sorologia negativa para *B. abortus*. O resultado apontou para uma situação de controle nas propriedades estudadas, indicando que a vacinação contra brucelose foi fator importante para soronegatividade dos rebanhos.

De acordo com JULIANO et al. (2007) o manejo sanitário para brucelose bovina em Núcleos de conservação de bovinos Pantaneiros iniciou-se em 1991, com a vacinação de bezerras e descarte de animais positivos. Segundo citações dos autores, a soropositividade que em 1990 era de 11,4%, em 1993, após a adoção de medidas de controle, foi reduzida para 9,8%. Em 2006 foram realizados exames sorológicos em 185 bovinos, com prevalência de 3,78% para brucelose.

ROCHA et al. (2009) analisaram os fatores de risco da brucelose bovina em Goiás e demonstraram que há maior chance de ocorrência em propriedades nas quais são adquiridos e introduzidos animais sem realização de testes ou sem o conhecimento da condição sanitária do rebanho de origem. A compra de animais infectados é amplamente reportada como o principal fator de introdução de brucelose em rebanhos livres.

Desde 1987, um número considerável de testes sorológicos têm sido desenvolvidos e adaptados para melhorar sua eficácia (NIELSEN, 2002). De fato, o diagnóstico da brucelose tem sido objeto de estudo em todo o mundo. Dentre os métodos destacam-se os testes de ELISA indireto, ELISA competitivo, polarização fluorescente, dentre outros (BRASIL, 2006; ABERNETHY et al., 2012).

O PNCEBT preconiza a triagem da brucelose bovina por meio do teste sorológico de referência: a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT). Os animais com resultado positivo podem ser classificados como infectados ou ser submetidos a um teste confirmatório, situação para a qual existem duas opções: a combinação das provas de soroaglutinação lenta e do 2-mercaptoetanol (2-ME) ou a reação de fixação do complemento (RFC) (BRASIL, 2006). De forma geral, a sensibilidade dos testes sorológicos para brucelose varia entre 65% e 95%, todavia a baixa especificidade constitui-se em sua maior limitação, pois a *Brucella* spp. pode apresentar reações cruzadas com outros agentes (NIELSEN, 2002; DEBEAUMOUNT et al., 2005).

As provas de soroaglutinação para detecção de anticorpos contra *B. abortus* têm como principal vantagem, o fato de estarem padronizadas internacionalmente. Para brucelose, o teste AAT indica a presença ou ausência de IgG<sub>1</sub>, imunoglobulina caracterizada por reagir em pH ácido, reduzindo assim, reações inespecíficas. Como o método apresenta boa sensibilidade, baixo custo e é de fácil execução, é bastante utilizado. Inúmeras avaliações têm comprovado sua superioridade na etapa de triagem, pois os animais recentemente infectados reagem mais cedo a esta prova e na fase crônica continuam reagindo por um tempo mais prolongado (ACYPRESTE et al., 2002).

Reações falso-positivas podem ocorrer e são decorrentes de dois fatores distintos. Primeiro, devido à presença de anticorpos não específicos presentes nas infecções por outras bactérias, como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O:157, ou *Pseudomonas* sp (NIELSEN, 2002). Segundo, podem decorrer como resultado da vacinação com B19 após a idade recomendada. Apesar disto, testes sorológicos constituem a base do diagnóstico em um programa sanitário para controle ou erradicação da brucelose animal, por proporcionarem uma alternativa que viabiliza o teste de um grande número de amostras (BRASIL, 2006; MEIRELLES-BARTOLI & MATHIAS, 2010).

Métodos diagnósticos que empregam agentes redutores, como o 2-ME, conferem maior especificidade à técnica, permitindo seu emprego como teste confirmatório para evitar sacrifício de animais sadios (ACYPRESTE et al., 2002; NIELSEN, 2002). Caracteriza-se como prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova lenta em tubos, também chamada soroaglutinação lenta (SAL). Baseia-se no fato de os anticorpos da classe IgM, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol. Essas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Desse modo, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta. Os resultados positivos na prova lenta e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou como devido a anticorpos residuais de vacinação com B19. Resultados positivos em

ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com infecção, devendo os animais ser considerados infectados (NIELSEN, 2002).

Em um estudo de avaliação comparativa dos testes propostos pelo PNCBET, foram analisadas 1.061 amostras de soros bovinos. Conforme esperado, o teste de triagem revelou ótima sensibilidade e os confirmatórios, ótima especificidade. Ainda assim, ressalta-se que o diagnóstico sorológico da brucelose é mais confiável quando obtido por meio dos resultados de vários testes (MEIRELLES-BARTOLI & MATHIAS, 2010).

Dentre os métodos diretos, o isolamento do organismo causador é considerado “padrão ouro” para a doença. Tal exame é feito a partir do sangue ou outros espécimes clínicos de pacientes infectados. Porém, a cultura tem sua sensibilidade diminuída em caso de doença subaguda ou crônica, ou quando antibioticoterapia é instituída antes da colheita do material (BRICKER, 2002; DEBEAUMONT et al., 2005). Ressalta-se ainda, que procedimentos de microbiologia convencional são demorados, pois a *Brucella* spp requer incubação prolongada, além de ser um patógeno de elevado potencial zoonótico, visto que sua manipulação representa risco considerável ao laboratorista (QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; TOMASO et al., 2010).

Na busca por ferramentas diagnósticas mais sensíveis e específicas métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido amplamente desenvolvidos a fim de detectar DNA de *Brucella* em amostras suspeitas. A PCR tem se mostrado mais sensível em pacientes com a doença focalizada, particularmente útil em circunstâncias em que a antibioticoterapia foi iniciada, além de ser mais segura para laboratoristas (DEBEAUMONT et al., 2005).

Os primeiros ensaios foram concebidos para explorar um único locus genético altamente conservado no gênero *Brucella*, como os genes *bcs*p31 ou 16S rRNA. A vantagem destes testes é a simplicidade e robustez dos mesmos, tornando-os úteis para triagem ou para identificação desde que a determinação da espécie ou biovar não seja essencial. Contudo há situações que requerem a determinação da espécie ou biovar de *Brucella* spp. envolvidos, sobretudo em investigações da fonte de infecção, a fim de nortear ações regulatórias em programas de erradicação (BRICKER, 2002).

Em um estudo de determinação do melhor espécime clínico no diagnóstico da brucelose humana, ZERVA et al. (2001) detectaram 94% de sensibilidade na PCR convencional empregando soro e 61% para sangue. A especificidade também foi excelente. KEID et al. (2010) compararam a PCR no soro com o teste com sangue total e obtiveram sensibilidade de 97,14% e 25,71%, respectivamente. A especificidade de ambos foi de 100%. YU & NIELSEN (2010) citaram que apesar de serem frequentemente empregadas na PCR, amostras sanguíneas possuem substâncias inibidoras que interferem nos resultados do teste e recomendam o tratamento deste espécime clínico a fim de aumentar a sensibilidade da técnica.

Em um estudo para comparar a eficácia de técnicas diagnósticas de brucelose em 162 ovinos, ILHAN et al. (2007) conseguiram isolar *B. melitensis* de apenas 1,2% das amostras sanguíneas e 17,2% dos linfonodos dos animais sorologicamente positivos. Produtos de PCR positivos foram obtidos de 27,7% das amostras de sangue e 29% dos linfonodos, revelando maior sensibilidade da técnica molecular, comparada à bacteriologia convencional.

BRICKER (2002) e CUTLER et al. (2005) apontaram como ressalva a ser considerada, a localização intracelular de *Brucella*, que está presente em fluidos como sangue, sêmen ou fluido cérebro-espinhal de forma intermitente. Para os autores, a aplicação de métodos baseados na procura de antígenos se restringe a surtos agudos, ao pós-parto, empregando leite, material de aborto ou nódulos linfáticos.

Segundo manual do PNCEBT (BRASIL, 2006), o controle da brucelose apoia-se basicamente em ações de vacinação massal de fêmeas, diagnóstico e sacrifício dos animais positivos. A eliminação das fontes de infecção, feita por meio de uma rotina de testes diagnósticos com sacrifício dos reagentes, é apresentada como a base das ações que visam certificar propriedades livres da doença. Em regiões onde a frequência da doença é baixa, a implantação de sistemas de vigilância, pode ser de grande valia na descoberta de focos de brucelose. O mais importante é conhecer muito bem tanto a epidemiologia da doença, quanto a população em que as ações deverão ser desenvolvidas, e escolher a melhor estratégia para implementá-las.

#### 1.2.4 Leptospirose

A leptospirose, doença infecto-contagiosa que acomete animais e humanos, é causada por qualquer espécie patogênica de bactérias do gênero *Leptospira*. Já foi diagnosticada em todos os continentes, no entanto sua ocorrência é mais elevada em países de clima tropical e subtropical, pois as condições ambientais favorecem a persistência e a disseminação do agente (FIGUEIREDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

A leptospirose é causada por espiroquetas flexíveis e helicoidais pertencentes ao gênero *Leptospira*. Na classificação sorológica o gênero encontra-se dividido em duas espécies, *Leptospira interrogans*, que compreende todas as cepas patogênicas e *Leptospira biflexa*, as saprófitas isoladas do ambiente. Ambas dividem-se em inúmeros sorovares definidos pela observação de aglutinação após absorção cruzada com antígenos homólogos. Sorovares antigenicamente relacionados são tradicionalmente agrupados em sorogrupos que, apesar de não possuírem relação taxonômica, são muito úteis para compreensão de aspectos epidemiológicos da doença (LEVETT, 2001).

Desde 1989, a classificação fenotípica tem sido substituída pela genotípica, baseada na hibridização por homologia de DNA. As genomoespécies não correspondem às duas espécies prévias (*L. interrogans* e *L. biflexa*) e sorovares patogênicos e não patogênicos podem ser classificados em uma mesma espécie (LEVETT, 2001). Atualmente são reconhecidas 13 espécies de leptospirosas patogênicas, com mais de 260 sorovares, e seis espécies saprófitas, com cerca de 60 sorovares (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

A reclassificação das leptospirosas baseada em fundamentos genéticos é taxonomicamente correta, contudo é incompatível com o sistema de sorogrupos amplamente empregado por clínicos e epidemiologistas ao longo dos anos. Assim, até que métodos de identificação baseados no DNA sejam validados e estejam amplamente disponíveis, a comunidade científica ainda emprega a classificação sorológica para leptospirosas patogênicas (LEVETT, 2001).

A leptospirose manifesta-se como doença sistêmica em seres humanos e animais domésticos, principalmente cães, bovinos e suínos, caracterizando-se por febre, insuficiência renal e hepática, manifestação pulmonar e falhas

reprodutivas. Contudo, as alterações clínicas variam consideravelmente. A maioria das infecções é inaparente e associada a sorovares aos quais os hospedeiros são adaptados, como Canicola em cães, Bratislava em equinos e suínos, Hardjo em bovinos e Australis e Pomona em suínos (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

Na saúde animal, as consequências desta infecção são de impacto econômico, tendo em vista o acometimento de animais de produção. Em bovinos a doença pode manifestar-se de forma aguda com presença de febre, hematúria, hemoglobinúria, meningite e morte. A forma crônica, por ser mais comum, assume maior importância em rebanhos infectados. Esta se caracteriza por marcante diminuição na fertilidade e na produção de leite e por aumento nos índices de mortalidade. As perdas reprodutivas também decorrem de abortos, fetos mumificados, nascimento de bezerros fracos, aumento do intervalo entre partos, cios irregulares, e retenção de envoltórios fetais (ELLIS, 1984; TOMICH et al., 2007; LANGONI et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009).

O epitélio dos túbulos renais de hospedeiros carreadores apresenta-se densamente colonizado por leptospiros que permanecem viáveis e protegidas da resposta imune deflagrada, em meio à substância amorfa semelhante a um biofilme, que se forma como um dos mecanismos de patogenicidade da bactéria. O agente eliminado na urina de animais infectados penetra na pele com abrasões e membranas mucosas e rapidamente desencadeia infecção sistêmica cruzando as barreiras teciduais e por disseminação hematológica. A infecção causa leptospiremia até que o hospedeiro desenvolva resposta imune, processo que em geral ocorre entre uma e duas semanas após a exposição. Leptospiros podem ser isoladas a partir da corrente circulatória dentro de poucos minutos após a inoculação e são detectadas em múltiplos órgãos por volta do terceiro dia após a infecção (KO et al., 2009). Depois de excretada na urina de animais infectados, a bactéria pode sobreviver por semanas ou até meses em solos úmidos e água (TRUEBA et al., 2004; RISTOW et al., 2008).

Um ponto fundamental na cadeia epidemiológica da leptospirose refere-se à divisão dos animais em hospedeiros de manutenção (ou carreadores) e acidentais (ou incidentais). Uma espécie animal pode se comportar como hospedeiro de manutenção para determinados sorovares e acidental para outros.

Assim, a doença é mantida na natureza pela infecção crônica dos túbulos renais destes primeiros, pois geralmente a infecção é endêmica e transmitida entre indivíduos por meio de contato direto. A intensidade de transmissão depende de fatores como clima, densidade populacional e grau de contato entre hospedeiros de manutenção e acidentais (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; HIGGINS, 2004, KO et al., 2009).

Em artigo de revisão publicado por LEVETT (2001) os bovinos foram citados como hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo, em estudos realizados em vários países. Na Austrália, os sorovares Hardjo e Pomona foram diagnosticados em abortos bovinos, com evidência sorológica de incidência muito superior do primeiro. Na Escócia e nos Estados Unidos o sorovar Hardjo também se revelou como o mais prevalente nos rebanhos estudados.

FAVERO et al. (2001) analisaram exames de soroaglutinação microscópica (SAM) efetuados no período de 1984 a 1997 em 31.325 bovinos de 1920 propriedades distribuídas em 540 municípios de 21 estados do Brasil. Os resultados revelaram que 84,1% das propriedades e 94,18% de municípios apresentavam pelo menos uma amostra positiva. A média de animais reagentes entre os estados foi de 49,51%, sendo os sorovares mais prevalentes, além das coaglutinações, Hardjo, Wolffi e Grippytyphosa. A predominância do sorovar Hardjo em rebanhos das regiões sul e sudeste do Brasil foi também verificada por VASCONCELLOS et al. (1997).

Em investigação da prevalência de anticorpos antileptospira em fêmeas bovinas no estado de Mato Grosso do Sul, foram detectados animais reagentes para um ou mais sorovares em 1.801 fêmeas (98,8%) de 161 (96,5%) rebanhos. O sorovar Hardjo (65,6%) foi apontado como o mais provável, seguido do sorovar Wolffi (12,3%). No estudo, os fatores de risco associados à infecção por bactérias do gênero leptospira foram o tipo de exploração pecuária de corte e a raça Zebu (FIGUEIREDO et al., 2009).

Ao estudar os fatores de risco associados à leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, OLIVEIRA et al. (2010) detectaram animais soropositivos em 77,9% das propriedades amostradas. O sorovar Hardjo (Hardjoprajtino) foi o mais prevalente, com 34,49% das propriedades positivas. Os fatores de risco para leptospirose foram rebanhos com

mais de 28 fêmeas bovinas em idade reprodutiva, presença de cervídeos, compra de animais, abate de animais na própria fazenda e utilização de pastos compartilhados.

Em um estudo realizado na microrregião de Goiânia, no Estado de Goiás, JULIANO (1999) observou prevalência de 81,9% de animais reagentes entre as 426 amostras de hemossoro bovino, provenientes de vacas leiteiras. Os principais sorovares encontrados foram Wolffi (36,1%), Icterohaemorrhagiae (20,5%), Hardjo (5,2%) e Tarassovi (4,9%). No trabalho de FAVERO et al. (2001), dentre as amostras provenientes de Goiás, 487 (34,6%) foram positivas na SAM. A porcentagem de municípios positivos foi de 100% e a de propriedades, 97,8%, sendo o sorovar Hardjo responsável por 63,7% e o sorovar Wolffi por 13% das reações positivas.

Também nesse Estado, MARQUES et al. (2010) testaram 4.571 amostras colhidas em 213 municípios. Foram detectadas 62,2% de amostras positivas para pelo menos um dos dezesseis sorovares testados, com predominância de coagulações (40,24%), seguidas pelos sorovares Wolffi (14,53%), Hardjo (12,70%), Grippytyphosa (10,55%) e Shermani (6,55%), revelando tendência enzoótica da infecção. A prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. mostrou-se associada aos seguintes fatores: estrato de produção, sendo mais prevalente em bovinos para corte; prática de inseminação artificial; raça dos animais; presença de ovinos e caprinos; presença de capivaras; compra de reprodutores em exposições e de outras propriedades; aluguel de pastos em alguma época do ano; presença de piquete maternidade e ocorrência de abortos.

Em estudo com gado Curraleiro, JULIANO (2006) detectou títulos aglutinantes para leptospirose em 31,6% dos 569 animais amostrados. Os sorovares mais prevalentes foram Hardjo e Wolffi reforçando a importância da espécie bovina na manutenção e disseminação desses sorovares como causadores da Leptospirose. A ocorrência de positividade para outros sorovares como Hebdomadis e Grippytyphosa sugere a participação de espécies silvestres na transmissão da infecção. SANTIN (2008) encontrou 58,6% de Curraleiros com sorologia positiva, dentre os 58 animais testados.

Ao realizarem levantamento de doenças da esfera reprodutiva em Núcleo de Conservação do Bovino Pantaneiro no Mato Grosso do Sul,

PELLEGRIN et al. (1997) detectaram soroprevalência de 21,7% para leptospirose em amostras colhidas em 1991 e 1992. Os autores recomendaram investigações anuais com descarte de animais positivos, quando possível, e utilização das medidas imunoproláticas disponíveis, visando minimizar os fatores que possam interferir nos índices de fertilidade da raça.

Segundo citações de SANTIN (2008), diversas espécies de mamíferos silvestres podem participar da epidemiologia da leptospirose como potenciais transmissores da infecção. A ocorrência de sorovares, dos quais o bovino é hospedeiro incidental, pode ser explicada pelo contato com estes animais silvestres. CASTRO (2006) relatou capivaras e cervídeos como reservatórios para *Leptospira* spp, sendo que os sorovares Wolffii e Grippotyphosa têm como reservatórios os marsupiais e roedores silvestres. O sorovar Pomona tem os canídeos, suínos e roedores sinantrópicos. GREENE et al. (2006) destacaram a importância da jaritataca ou cangambá, do gambá e do mão pelada, atuando como hospedeiros reservatórios primários dos sorovares Pomona e Grippotyphosa.

Em estudo de soroprevalência para *Leptospira* em animais silvestres do Pantanal Sul-matogrossense GIRIO et al. (2004) colheram 315 amostras de sangue dos seguintes animais: boi baguá (*Bos taurus indicus*), porco-monteiro (*Sus scrofa*), búfalo (*Bubalus bubalis*), quati (*Nasua nasua*), veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), veado-mateiro (*Mazama americana*) e ovinos (*Ovis aries*). Os autores detectaram 20,3% de amostras reagentes para pelo menos um sorovar patogênico. Os sorovares mais frequentes foram: Pomona, para búfalos e ovinos; Icterohaemorrhagiae, para ovinos, veados-campeiros e suínos; e Copenhageni, para veados-campeiros e suínos.

Ainda no Pantanal, na sub-região de Nhecolândia VIEIRA et al. (2011), realizaram levantamento de *Leptospira* spp. em 266 animais silvestres. Ao empregar a soroaglutinação microscópica o autor detectou soropositividade de 5,9% em veado campeiro (*Otoceros bezoarticus*), com predominância dos sorovares Pomona e Butembo; 34,21% em lobinho (*Cerdocyon thous*), com predominância de Hardjobovis; 10,2% para rato do campo (*Trichomys pachyurus*) e 14,28% para jaguatirica (*Leopardus pardalis*), com predomínio de

Icterohaemorrhagiae e 34,09% em quatis (*Nasua nasua*), com predominância de Pomona.

Quando a infecção é determinada pelo sorovar Hardjo, cuja principal forma de transmissão é de bovino a bovino, três medidas devem ser praticadas simultaneamente: proibir a introdução de novos animais no rebanho, salvo quando negativos ao sorodiagnóstico; tratar os animais sororeagentes e fortalecimento da imunidade utilizando uma vacina que contenha as principais variedades presentes na região. O processo de controle deve ser monitorado por sorodiagnóstico anual. No caso de infecções incidentais, determinadas por sorovares que não são mantidos pelos bovinos, como Pomona, Icterohaemorrhagiae ou Bataviae, deve-se identificar de que forma o rebanho está sendo exposto ao contato com os reservatórios naturais destas variedades, como ratos e animais silvestres. Somente desta forma será possível, através de medidas de higiene e de tecnificação da criação, controlar a leptospirose (LILENBAUM & SANTOS, 1995).

Os testes utilizados no diagnóstico da leptospirose dividem-se entre os que detectam anticorpos contra a bactéria e os que buscam o organismo ou seu DNA, em tecidos e fluidos. Cada um dos procedimentos diagnósticos apresenta vantagens e desvantagens. Alguns dos ensaios sofrem com a perda de sensibilidade e outros estão propensos a ter baixa especificidade. Portanto, não há uma única técnica recomendada para uso em todas as situações clínicas e há um consenso que a combinação de testes leva a maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico. Em diagnósticos individuais, o teste sorológico é recomendado combinado com uma ou mais técnicas na identificação do organismo em tecidos ou fluidos corpóreos (BOLIN, 2003; MARQUES, 2008).

Anticorpos podem ser detectados no sangue por volta de cinco a sete dias após o início dos sinais, assim ELISA e SAM são responsáveis pela maior parte do diagnóstico dos casos de leptospirose. Ao comparar as duas técnicas foi verificada correlação entre os resultados de ambas (TOMICH et al., 2007). O ELISA apresenta como principais vantagens a utilização de antígenos inativos, a objetividade do resultado e a maior simplicidade. Geralmente é um teste sensível, mas não possui a especificidade para sorovar. Novas técnicas têm sido desenvolvidas com base na detecção de anticorpos contra proteínas de superfície

e lipoproteínas de leptospira, porém ainda não estão amplamente disponíveis. O método mais empregado ainda é o IgM ELISA para identificação de infecções recentes e para triagem de rebanhos nos quais a vacinação não seja praticada (LEVETT, 2001; BRASIL, 2009; OIE, 2009).

Apesar de inúmeras metodologias terem sido desenvolvidas a SAM permanece como a principal técnica sorológica, considerada “padrão ouro” na investigação da infecção. No teste de SAM é empregada suspensão de microrganismos vivos de diferentes sorovares de leptospira para detecção de anticorpos aglutinantes. Este ensaio requer pessoal devidamente treinados para sua execução, em função da subjetividade da interpretação, que leva a resultados diferentes entre laboratórios, além do risco representado pela manutenção de culturas vivas. Ainda assim, o valor epidemiológico do método é indiscutível, pois permite a indicação presuntiva do sorovar e principalmente sorogrupo envolvido na infecção. A ampla ocorrência de reações cruzadas entre diferentes sorogrupos na fase aguda, seguida por relativa especificidade na fase de convalescência resulta da detecção de anticorpos da classe IgG e IgM pela SAM e da presença de vários antígenos comuns entre leptospiras (LEVETT, 2001).

De acordo com BOLIN (2003), a interpretação dos resultados de testes sorológicos é complicada por inúmeros fatores, entre os quais incluem amostras com reações cruzadas, títulos de anticorpos induzidos por vacinação ou perda de consenso entre o título de anticorpos e os indicativos de infecção ativa. Um título aglutinante superior ou igual a 100 é considerado significativo por muitos pesquisadores. O ponto de corte pode ser excessivo em animais vacinados e pode não ser alcançado, na infecção de hospedeiro de manutenção. Portanto, o diagnóstico da leptospirose baseado numa única amostra deve ser realizado com cautela e com total consideração do quadro clínico e histórico de vacinação.

A leptospirose caracteriza-se pela inespecificidade dos sinais clínicos e, muitas vezes, a enfermidade é inaparente com envolvimento de sorovares aos quais os hospedeiros estão adaptados. Por tal motivo, torna-se importante o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais precoces, como a PCR (HERNÁNDEZ-RODRIGUES et al., 2011).

Desde a década de 90 diversos protocolos bastante sensíveis para detecção de DNA de leptospira têm sido descritos (ADLER & MOCTEZUMA,

2010). A PCR consiste em técnica molecular de diagnóstico, potencialmente rápida e específica. Apesar de ser mais sensível do que a cultura a sensibilidade pode cair para 50% quando se emprega o soro como espécime clínico provavelmente em decorrência da quantidade reduzida de leptospiros neste material. A análise de amostras de urina caracteriza-se em boa alternativa, já que por volta do 10<sup>o</sup> dia após infecção, o agente dificilmente é detectado no sangue, ao passo que nos rins e urina pode estar presente por longos períodos (LEVETT, 2001; FONTANA, 2011).

BROWN et al. (1995) também obtiveram sucesso ao empregar a técnica em amostras de sangue e urina de pacientes na fase aguda da doença, indicando a viabilidade da técnica no diagnóstico precoce da leptospirose, sobretudo quando anticorpos ainda não são detectáveis. HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ et al. (2011) adotaram a PCR utilizando como espécime clínico a urina de bovinos e alcançaram ótimos resultados ao empregar *primers* específicos para leptospiros patogênicos.

Vários ensaios direcionados à determinação da genomoespécie infectante têm sido desenvolvidos, visto que sua identificação é importante na compreensão da epidemiologia e, conseqüentemente, influencia na tomada de decisões para ações de controle na saúde animal e saúde pública. Ainda assim, a maior parte dos protocolos disponíveis direciona-se à identificação de leptospiros patogênicos, sem distinção do sorovar (LEVETT, 2001).

### **1.3 Justificativa**

A Declaração de Interlaken, sobre recursos genéticos animais (FAO/Embrapa, 2010), ressalta que os bovinos de raças localmente adaptadas originaram-se de animais que acompanharam antepassados em toda ampla gama de climas e de ecossistemas do mundo, onde se mostraram extremamente adaptáveis. Hoje, diante das necessidades de uma população crescente, das modificações nas exigências dos consumidores e do enorme desafio lançado pelas mudanças climáticas e por doenças emergentes, se faz necessário, uma

vez mais, recorrer a essa adaptabilidade e a esse potencial para enfrentar um futuro incerto.

A realização deste trabalho se justifica pelo risco que a brucelose e a leptospirose representam na preservação das raças Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro. É importante considerar ainda, que além do impacto negativo dessas doenças na saúde animal, elas trazem prejuízos à saúde humana, por serem zoonoses.

As técnicas empregadas para conservação de recursos genéticos implicam em maior circulação dos animais entre os criatórios, que traz como desvantagem a maior chance de disseminação de doenças. Desta forma, o conhecimento da situação sanitária dos rebanhos e de métodos diagnósticos eficazes, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle das enfermidades nos núcleos de criação envolvidos no programa de conservação.

#### **1.4 Objetivos**

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a situação epidemiológica da brucelose e da leptospirose em núcleos de conservação de bovinos Curraleiros Pé Duro e Pantaneiros no Cerrado e Pantanal, utilizando métodos sorológicos e moleculares no diagnóstico de rebanho destas enfermidades.

Os objetivos específicos foram:

- Determinar a frequência da brucelose em bovinos Pantaneiros e Curraleiros, por meio do teste de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado (AAT) e confirmação pela soroaglutinação lenta e 2-ME;
- Determinar a frequência da leptospirose em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, por meio do teste de soroaglutinação microscópica (SAM);
- Identificar os fatores associados à ocorrência destas zoonoses nos criatórios de gado Curraleiro e Pantaneiro visitados;
- Inferir sobre o papel de reservatórios silvestres na epidemiologia da leptospirose em núcleos de conservação de gado Curraleiro e Pantaneiro;

- Empregar métodos sorológicos e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de infecção por *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em bovinos, para avaliar a concordância dos resultados de tais testes.

## Referências

1. ABERNETHY D. A.; MOSCARD-COSTELLO, J.; DICKSON E.; HARWOOD R.; BURNS K.; MCKILLOP E.; MCDOWELL S.; PFEIFFER D. U. Epidemiology and management of a bovine brucellosis cluster in Northern Ireland. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam. v. 98, p. 223–229, 2011
2. ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis e enfermidades transmissíveis comunes al hombre y a los animales**, v. 1, 3.ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2001. 398 p.
3. ACYPRESTE, C. V.; SILVA, L. A. F.; MESQUITA, A. J.; FIORAVANTI, M. C. S.; DIAS FILHO, F. C.; RAMOS, L. S. Diagnóstico da frequência da brucelose bovina em vacas e lactação na bacia leiteira de Goiânia pelas provas do anel de leite e rosa bengala. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 3, p. 59-65, 2002.
4. ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 287–296, 2010.
5. ARAÚJO, V. E. M.; NAVEDA, L. A. B.; SILVA, J. A.; CONTRERAS, R. L. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005.
6. BOLIN, C. A. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. Western Dairy Management Conference, 6., **Proceedings...**, Reno, p. 155-160, 2003.
7. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leptospirose. In: **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Caderno 8.

9. BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 435-446, 2002.
10. BROWN, P. D.; GRAVEKAMPS, C.; CARRINGTON, D. G.; VAN DE KEMPS, H.; HARTSKEERLS, R. A.; EDWARDS, C. N.; EVERARD, C. O. R.; TERPSTRA, W. J.; LEVETT, P. N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 43, p. 110-114, 1995.
11. CARDELLINO, R. A.; BOYAZOGLU, J. Research opportunities in the field of animal genetic resources. **Livestock Science**. v. 120, p. 166-173. 2009.
12. CARVALHO, J. H.; GIRÃO, R. N. Conservação de recursos genéticos animais: a situação do bovino Pé-duro ou Curraleiro. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2., 1999, **Anais eletrônicos...** [CD-ROM]. Brasília: Sirgeal, 1999.
13. CASTRO, V. **Estudo da soroprevalência da leptospirose bovina em fêmeas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil**. 2006, 106f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
14. CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, p. 46-55, 2009.
15. CUTLER, S. J.; WHATMORE, A. M.; COMMANDER, N. J. A review: Brucellosis – new aspects of an old disease. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 6, p. 1270–1281, 2005.
16. DEBEAUMONT, C.; FALCONNET, P. A.; MAURIN, M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. Berlin, v. 24, p. 842-845, 2005.

17. EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 51, p. 39-52, 2002.
18. ELLIS, W. A., Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Veterinary Medicine**, London, v. 2, p. 411-422, 1984.
19. FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2.ed. Melbourne: MedSci, 1999. 272p.
20. FAO / EMBRAPA. **Plano de ação mundial para os recursos genéticos animais e declaração de Interlaken**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 40 p.
21. FAO. **The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture**, Rome: FAO, 2007. 511p.
22. FAVA, C.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C. R.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E. M.; STEGANO, E.; OKUDA, L. H.; VASCONCELLOS, S. A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 25-33, 2003.
23. FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.
24. FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P., FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 375-381, 2009.
25. FIORAVANTI, M. C. S., JULIANO, R. S.; COSTA, G. L.; ABUD, L. J.; CARDOSO, W. S. Características dos criatórios de bovinos da raça curraleiro nos Estados de Goiás e Tocantins. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SAVANAS TROPICAIS, 2. e SIMPÓSIO NACIONAL

- DO CERRADO, 9., 2008, Brasília. **Anais eletrônicos...** [CD ROM], Brasília: EMBRAPA, 2008.
26. FIORAVANTI, M. C. S.; JULIANO, R. S.; COSTA, G. L.; ABUD, L. J.; CARDOSO, W. S.; CARPIO, M. G.; COSTA, M. F. O. Conservación del bovino Curraleiro: cuantificación del censo y caracterización de los criadores. **Animal Genetic Resources**, Roma, v. 48, p. 109–116, 2011.
27. FONTANA, I. **Avaliação do papel do porco monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do pantanal sul-matogrossense**. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
28. GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; FILHO, M. M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 165-169, 2004.
29. GODFROID J.; SCHOLZ H. C.; BARBIER T.; NICOLAS C.; WATTIAU P.; FRETIN D.; WHATMORE A. M.; CLOECKAERT A.; BLASCO J. M.; MORIYON I; SAEGERMAN C.; MUMA J. B.; AL DAHOUK S.; NEUBAUER H.; LETESSON J. J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. **Preventive Veterinary Medicine**. Fort Collins, n. 102, p.118–131, 2011
30. GREENE, C. E.; MILLER, M. A.; BROW, C. A. Leptospirosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006. p. 273-281.
31. HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ. P.; DÍAZ C. A.; DALMAU, E. A.; QUINTERO, G. M. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 84, p.1-7, 2011.
32. HIGGINS, R. Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. **Revue Scientifique**

- et Technique: Office International des Épizooties**, Paris, v. 23, n. 2, p. 569-581, 2004.
33. ILHAN, Z.; AKSAKAL, A.; EKIN, I. H.; GULHAN, T.; SOLMAZ, H.; ERDENLIG, S. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, p. 301–306, 2008.
34. JERGEFA. T.; KELAY, B.; BEKANA, M.; TESHALE, S.; GUSTAFSON, H.; KINDAHL, H. Epidemiological study of bovine brucellosis in three agro-ecological areas of central Oromiya, Ethiopia. **Revue Scientifique et Technique: Office International des Épizooties**, Paris, v. 28, n. 3, p. 933-943, 2009.
35. JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça curraleiro**. 2006, 125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiás.
36. JULIANO, R. S. **Estudo da prevalência e aspectos epizootiológicos da leptospirose bovina, no bebanho de fêmeas mestiças produtoras de leite na microregião de Goiânia – GO**. 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
37. JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; ABREU, U. G. P.; SERENO, J. R. B.; JACOMINI, L. A. Situação Sanitária de Bovinos Pantaneiros: Brucelose e Tuberculose. **Embrapa Pantanal Circular Técnica**, Corumbá, n. 70, p.1-4, 2007.
38. JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; SERENO, J. R. B.; ABREU, U. G. P.; JAYME, V. S.; SILVA, A. C.; MACHADO, R. Z.; BRITTO, W. M. E. D.; ALFIERI, A. A.; SANTOS, S. A. Aspectos Sanitários dos Núcleos de Conservação *in situ* de Bovinos Pantaneiros. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Corumbá: Embrapa Pantanal, n. 103, p.1–15, 2011. [online] Disponível em: <http://www.cpap.Embrapa.br/publicacoes/online/BP103.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2012.

39. KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; SALGADO, V. R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. **Veterinary Record**, London, v. 167, p. 96-99, 2010.
40. KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 733-747, 2009.
41. LANGONI, H.; SOUZA, L. C.; DA SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; SILVA, R. C. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 190-199, 2008.
42. LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.
43. LILENBAUM, W.; SANTOS, M. R. C. Leptospirose em reprodução animal: III - Papel do serovar *hardjo* nas leptospiroses bovinas no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1995.
44. MARIANTE A.S.; EGITO A. A.; ALBUQUERQUE M. S. M.; PAIVA S.R.; RAMOS A. F. Managing genetic diversity and society needs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, supl. esp, p.127-136, 2008.
45. MARQUES, A. E. **Prevalência de anticorpos anti-leptospira spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de goiás**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
46. MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; BRITO, W. M.; ELSNER D.; FIORAVANTI, M. C. S.; PARREIRA, I. M.; JAYME, V. S. Prevalência de anticorpos anti-*leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 607-617, jul/set. 2010.
47. MAZZA, M. C. M.; MAZZA, C. A.; SERENO, J. R. B.; SANTOS, S. A. L.; MARIANTE, A. S. Conservation of pantaneiro cattle in Brazil. historical

- origin. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, vol. 41, núm. 154 (extra), p. 443 - 453, 1992.
48. MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 11-17, jan./mar. 2010.
49. NEIVA, A. C. G. R.; SERENO, J. R. B.; FIORAVANTI, M. C. S. Indicação geográfica na conservação e agregação de valor ao gado curraleiro da comunidade kalunga. In: CONGRESSO IBERICO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS ANIMALES, 7., 2010, Asturias. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, 2011.
50. NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by sorology. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.90, p.447-459, apr. 2002.
51. OIE. Bovine Brucellosis. In: **Terrestrial Manual**. [online]. 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> Acesso em 27 set. 2011.
52. OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n. 5, p. 398-402, mai. 2010.
53. PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; MAZZA, M. C. M.; LEITE, R. C. Doenças da reprodução e conservação genética: levantamento no núcleo de conservação do bovino pantaneiro. **Embrapa Pantanal Comunicado Técnico**, Corumbá, n. 21, p. 1-4. 1997.
54. POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 1-5, 2009.
55. PRIMO, A T. El ganado bovino ibérico em las américas 500 años despues. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 41, n. 154, p. 421-432, 1992.

56. QUEIPO-ORTUÑO, M. L.; MORATA, P.; OCÓN, P.; MANCHADO, P.; COLMENERO, J. D. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral blood PCR-assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 11 p. 2927–2930, nov. 1997.
57. RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737p.
58. RISTOW, P.; BOURHY P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, M. C. P.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospire. **Microbiology**. Spencers Wood, v. 154, p. 1309–1317, 2008.
59. ROCHA, W. V.; GONÇALVES, V. S. P.; COELHO, C. G. N. F. L.; BRITO, W. M. E. D.; DIAS, R. A.; DELPHINO, M. K. V. C.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R.; BRITO, L. A. B. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 27-34, 2009.
60. SANTIN, A. P. I. **Perfil sanitário de bovinos da raça Curraleiro frente a enfermidades de importância econômica**. 2008. 78 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
61. SERRANO, G. M. S. **Uso de marcadores moleculares RAPD na caracterização genética das raças bovinas nativas brasileiras**. 2001. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal.
62. TABERLET P.; COISSAC E.; PANSU J.; POMPANON F. Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. **Comptes Rendus Biologies**. v. 334. p. 247 – 254, 2011.
63. TOMASO, H.; KATTAR, M.; EICKHOFF, M.; WERNERY, U.; AL DAHOUK, S.; STRAUBE, E.; NEUBAUER, H.; SCHOL, H. C. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of *Brucellae* in tissue using quantitative real-time PCR. **BMC Infectious Diseases** [online], v. 10,

- n. 100, 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/100>. Acesso em 03 may. 2011.
64. TOMICH, R. G. P.; BOMFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Leptospirosis serosurvey in bovines from Brazilian Pantanal using Igg Elisa with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n. 38, p. 674-680, 2007.
65. TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLEN, P.; HAAKE, D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Journal of Microbiology**. New York. v. 7, 35–40 (2004).
66. VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose bovina. **Atualização Técnica – Laboratórios Pfizer Ltda.**, Guarulhos, n. 34, p. 1-5, 1997.
67. VIEIRA, A.; ROSINHA, G. M. S.; OLIVEIRA, C. E. O.; VASCONCELLOS, S. A.; LIMA-BORGES, P. A.; TOMÁS, W. M.; MOURÃO, G. M.; LACERDA, A. C. R.; SOARES C. O.; ARAÚJO, F. R.; PIOVEZAN, U.; ZUCCO, C. A.; PELLEGRIN, A. O. Survey of *Leptospira* spp in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Pantanal wetlands of the state of Mato Grosso do Sul, Brazil by serology and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, n.6, p. 2011.
68. YU, W. L.; NIELSEN, K. Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. **Croatian Medicine Journal**. v.51, p. 306-313, 2010.
69. ZERVA, L.; BOURANTAS, K. S.; KANSOUZIDOU, M.; LEGAKIS, N. J. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1661-1664, apr. 2001.

## CAPÍTULO 2 – FREQUÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À BRUCELOSE E À LEPTOSPIROSE EM BOVINOS CURRALEIROS PÉ DURO E PANTANEIROS NO CERRADO E PANTANAL

### Resumo

Para determinar a frequência e os fatores associados à brucelose e à leptospirose em bovinos de raças locais, foram testados soros de 1.280 bovinos Curraleiros Pé Duro e 248 bovinos Pantaneiros em amostragem de conveniência. Para diagnóstico de brucelose adotou-se o teste de antígeno acidificado tamponado e confirmação pelo teste de soroaglutinação lenta e 2 mercaptoetanol e para leptospirose empregou-se a soroaglutinação microscópica. A frequência de brucelose em bovinos Curraleiros foi de 0,7% para animais e 25% para rebanhos. Todas as sororeagentes eram fêmeas com idade superior a 24 meses caracterizando frequência de brucelose de 0,83% nesta categoria. Em Pantaneiros todos os bovinos apresentaram sorologia negativa para *Brucella abortus*, indicando o controle da infecção. A frequência anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos Curraleiros foi de 44,8% e em Pantaneiros 51,2%. 100% dos criatórios de ambas as raças apresentaram animais soropositivos. Os fatores associados à leptospirose em bovinos Curraleiros foram acesso à área alagadiça, ocorrência de abortos, vacinação contra leptospirose e prática de abate na propriedade. Para bovinos Pantaneiros os fatores associados foram o sexo e a idade, estando sob maior risco fêmeas na faixa etária entre 12 e 24 meses. A maior frequência de anticorpos contra os sorovares Hardjo e Wolffi reforçam o papel do bovino como fonte de infecção no rebanho. A ocorrência de sororeação para os sorovares Grippytyphosa, Patoc e Pomona no Pantanal e Grippytyphosa, Shermani, Pomona e Hebdomadis no Cerrado, sugere a participação da fauna local na epidemiologia da leptospirose bovina nos Núcleos de conservação das raças Pantaneiro e Curraleiro Pé Duro.

**Palavras-chave:** *Brucella abortus*, *Leptospira* spp. epidemiologia, raças bovinas locais.

## FREQUENCY AND FACTORS ASSOCIATED WITH BRUCELLOSIS AND LEPTOSPIROSIS IN CURRALEIRO “PÉ DURO” AND PANTANEIRO BREEDS IN CERRADO AND PANTANAL

### Abstract

We analyzed serum of 1,280 Curraleiro and 248 Pantaneiro animals on convenience sampling to determine the frequency and factors associated with leptospirosis and brucellosis in local bovine breeds. We employed microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis and buffered acidified antigen test (Rose Bengal plate test) for brucellosis and the 2- mercaptoethanol plus standard tube agglutination test for confirmation. The frequency of brucellosis in Curraleiro was 0.7% for animals and 25% for herds. In Pantaneiros all animals tested negative for *Brucella abortus*, indicating infection control. The frequency of anti-*Leptospira* antibodies was 44.8% in Curraleiro and 51.2% in Pantaneiro breeds. All herds of both breeds showed positive animals. The factors associated with leptospirosis were access to wetland, abortions, vaccination against leptospirosis and practice of slaughtering the property for Curraleiro animals and sex and age, with the highest risk for females aged between 12 and 24 months for Pantaneiro animals. The high frequency of antibodies against serovars Hardjo and Wolffi reinforce the function of bovine as a source of infection in the herd. The occurrence of serum reaction for serovars Grippytyphosa, Patoc and Pomona in Pantanal and Grippytyphosa, Shermani, Pomona and Hebdomadis in Cerrado biosystem suggests the participation of the local wildlife in the epidemiology of bovine leptospirosis in nuclei of in situ conservation of Curraleiro and Pantaneiro bovine breeds.

**Keywords:** *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., epidemiology, local bovine breeds

## 1 Introdução

No Brasil, diversas raças localmente adaptadas desenvolveram-se a partir de animais trazidos pelos colonizadores. Esses bovinos adquiriram características únicas como rusticidade, prolificidade e provavelmente, resistência a parasitas e doenças. Na busca de melhoria na produtividade, adotou-se um modelo produtivo que culminou com a erosão genética, a diminuição e o desaparecimento de algumas raças locais. Atualmente, dentre as cinco raças bovinas localmente adaptadas existentes no país, quatro encontram-se em risco de extinção (FIORAVANTI et al., 2011). O gado Curraleiro e Pantaneiro estão entre elas. FIORAVANTI et al. (2011) afirmaram que o efetivo populacional de Curraleiros é de aproximadamente 3.700 animais. Segundo JULIANO et al. (2011) o número de bovinos Pantaneiros nos dois principais rebanhos da raça não totaliza 500 reses.

A fim de caracterizar tais raças bovinas e gerar dados para constituição de um modelo de exploração pecuária sustentável, em 2011 foi instituída a Rede Pró-Centro Oeste para caracterização, conservação e uso das raças bovinas locais brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro.

Como os rebanhos são pequenos, podem ser utilizadas técnicas de manejo destinadas à maior circulação dos animais entre os criatórios e de biotecnologias destinadas a maximizar a eficiência reprodutiva da população. Contudo, tais procedimentos aumentam as chances de disseminação de doenças. Nesse contexto, o conhecimento da situação sanitária de um rebanho é imprescindível para criação de estratégias para prevenção e controle de enfermidades dentro e dentre os núcleos de criação envolvidos no programa de conservação (JULIANO et al., 2007).

As enfermidades que envolvem a esfera reprodutiva, responsáveis pela ocorrência de abortos, infertilidade, esterilidade ou nascimento de produtos debilitados, constituem condição de especial interferência no processo produtivo, aspecto que se agrava quando o agente envolvido, além de afetar um amplo espectro de espécies animais susceptíveis, atinge também o ser humano (MARQUES et al., 2010). Este é o caso da brucelose e da leptospirose, pois ambas são enfermidades infecto-contagiosas, transmissíveis ao homem, de

grande impacto sanitário e econômico em rebanhos bovinos e na saúde pública (ACHA & SZYFRES, 2001).

A brucelose é uma doença infecciosa crônica causada por uma bactéria pertencente ao gênero *Brucella*, que afeta principalmente o sistema reprodutivo, podendo provocar abortamentos no terço final da gestação (RADOSTITIS et al., 2002).

Estudos sobre aspectos epidemiológicos da brucelose em bovinos de raças locais têm revelado diminuição da frequência de animais sororeagentes. Ao analisar os aspectos sanitários de bovinos Curraleiros no Estado de Goiás e Tocantins, JULIANO (2006) detectou prevalência de 1,23% para a infecção. SANTIN (2008) testou soro de 116 fêmeas curraleiras e obteve sorologia negativa para *Brucella abortus*. Em núcleos de conservação de bovinos Pantaneiros, a soropositividade em 1990 era de 11,4%. Após a adoção de medidas de controle, foi reduzida para 9,8% em 1993 e para 3,78% em 2006 (JULIANO et al., 2007).

Segundo recomendações do PNCEBT (BRASIL, 2006) o controle da brucelose apoia-se basicamente em ações de vacinação massal de fêmeas, diagnóstico e sacrifício dos animais positivos. A eliminação das fontes de infecção, feita por meio de uma rotina de testes diagnósticos com sacrifício dos reagentes, é apresentada como a base das ações que visam certificar propriedades livres da doença.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001). Manifesta-se como doença sistêmica em seres humanos e animais domésticos, principalmente cães, bovinos e suínos, caracterizando-se por febre, insuficiência renal e hepática, manifestação pulmonar e falhas reprodutivas (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

A frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em rebanho de bovinos Curraleiros foi de 31,6% dentre os 569 animais amostrados por JULIANO (2006). SANTIN (2008) encontrou 58,6% de bovinos desta raça com sorologia positiva, dentre os 58 testados. Os sorovares mais prevalentes nos dois estudos foram Hardjo e Wolffii, reforçando a importância da espécie bovina na manutenção e disseminação desses sorovares. Ao realizarem levantamento de doenças da esfera reprodutiva em núcleo de conservação do bovino Pantaneiro no Mato

Grosso do Sul, PELLEGRIN et al. (1997) detectaram soroprevalência de 21,7% para leptospirose. No levantamento feito por JULIANO et al (2011) a prevalência média de sororeagentes para leptospirose nos núcleos de conservação desta raça foi de 30,3%.

PELLEGRIN et al. (1997) recomendaram investigações anuais em rebanhos de raças locais, com descarte de animais positivos, quando possível, e utilização das medidas imunoproláticas disponíveis, visando minimizar os fatores que possam interferir nos índices de fertilidade da raça. MARQUES et al. (2010) citaram que quando a infecção é determinada por sorovares transmitidos de bovino a bovino, três medidas devem ser praticadas simultaneamente: proibir a introdução de animais no rebanho sem realização de sorologia, tratar os animais sororeagentes e fortalecimento da imunidade utilizando uma vacina que contenha as principais variedades presentes na região. No caso de infecções incidentais, determinadas por sorovares que não são mantidos pelos bovinos deve-se identificar de que forma o rebanho está sendo exposto ao contato com os reservatórios naturais destas variedades. Somente desta forma será possível, através de medidas de higiene e de tecnificação da criação, controlar a leptospirose.

Os objetivos deste trabalho foram determinar a frequência da brucelose e da leptospirose em bovinos das raças locais, Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro e identificar os fatores associados à ocorrência destas zoonoses no Cerrado e Pantanal.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Área de estudo**

A investigação epidemiológica em bovinos Curraleiros foi realizada com amostras oriundas de região característica de Cerrado, que consiste no segundo maior bioma da América do Sul, ocupando 22% do território nacional. A sua área contínua incide sobre os estados de Goiás, Tocantins e Piauí, onde foram feitas as colheitas, além do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia,

Maranhão, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos encraves em outros três estados. O clima dominante é o tropical quente subúmido, com apenas duas estações, uma seca e uma chuvosa. A precipitação varia entre 600 e 2.200 mm anuais, com temperaturas médias anuais entre 22° C e 27° C. A cobertura vegetal predominante é a savana, ocorrendo ainda algumas formações florestais (IBGE, 2004).

O soro dos bovinos Pantaneiros foi colhido nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, abrangidos pelo bioma Pantanal, que se constitui na maior superfície inundável interiorana do planeta, e Cerrado. De acordo com IBGE (2004) o Pantanal ocupa 1,76% da área total do território brasileiro. As inundações anuais, por atingirem grande extensão, serem de longa duração e por imprimirem modificações biológicas e sócio-econômicas, constituem o fator determinante da existência de um macrossistema classificável como bioma. O clima é quente e chuvoso no verão e ameno e seco no inverno. A precipitação varia entre 1.000 a 1.400 mm anuais concentrada entre os meses de dezembro a março.

## 2.2 Colheita, remessa e armazenamento de amostras

Foram utilizadas 1.528 amostras sanguíneas de bovinos Curraleiros e Pantaneiros de diferentes sexos e idades, componentes de um banco de amostras biológicas colhidas por ocasião das visitas aos núcleos de conservação das raças em atividades da Rede Pró-Centro Oeste.

Para a colheita de sangue procedeu-se punção da veia jugular, empregando tubos esterilizados com vácuo e sem anti-coagulante, do tipo *vacutainer*, deixados em descanso por seis horas em temperatura ambiente para o dessoramento. O soro obtido de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 mL, remetidos em caixas isotérmicas contendo bolsas de gelo reciclável para o Laboratório Multiusuário de Pós-Graduação EVZ/UFG e armazenados em freezer a -18°C.

A amostra foi composta por 1.280 soros de bovinos Curraleiros, provenientes de 20 criatórios nos Estados do Piauí, Goiás e Tocantins e 248

soros de bovinos Pantaneiros, oriundos de quatro propriedades, localizadas no Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Tabela 1).

TABELA 1 - Origem das amostras de soro de bovino das raças Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro, submetidas à sorologia para determinação da prevalência de brucelose e leptospirose

<b>Raça</b>	<b>Estado</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Curraleiro Pé Duro	Piauí	416	27,2
	Goiás	707	46,3
	Tocantins	157	10,3
Pantaneiro	Mato Grosso do Sul	150	9,8
	Mato Grosso	98	6,4
<b>Total</b>		<b>1.528</b>	<b>100,0</b>

### 2.3 Avaliações laboratoriais

Para detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus* foi realizada a prova de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado (AAT, Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar, Curitiba, Paraná), seguindo a recomendação do MAPA (BRASIL, 2006). Esta técnica baseia-se na adição em placa de 30 µL de antígeno e 30 µL de soro a ser testado, seguida de agitação suave durante quatro minutos. A leitura é feita com luz indireta e a reação positiva baseia-se na presença de grumos.

Os soros reagentes foram encaminhados ao Laboratório de Análise e Diagnóstico Veterinário (Labvet) credenciado pelo MAPA, para realização do teste confirmatório pela combinação da prova de soroaglutinação lenta (SAL) e do 2-mercaptoetanol (2-ME).

Para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp foi adotada a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). A metodologia e interpretação adotadas foram aquelas descritas no *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* (OIE, 2009). Esta técnica baseia-se na adição de soro suspeito do animal em diluições crescentes a culturas de diversas sorovariedades de *Leptospira* spp. mantidas em laboratório em meios específicos.

Foram empregados 19 sorovares de *Leptospira* spp. que compõe a coleção de culturas vivas mantidas no Laboratório de Leptospirose da EVZ/UFG, onde a sorologia foi realizada. Foram testados soros frente aos sorovares Andamana, Australis, Autumnalis, Bratislava, Butembo, Canicola, Castelonis, Copenhageni, Grippothyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sentot, Shermani, Tarassovi e Wolffi.

Na etapa de triagem os soros que apresentaram 50% ou mais de leptospiras aglutinadas, considerando os respectivos controles, foram submetidos a uma segunda prova para titulação de anticorpos com os antígenos identificados como reagentes, sendo consideradas positivas amostras que apresentaram anticorpos aglutinantes em uma diluição mínima de 1:100.

O sorovar considerado como provável causador da infecção foi o que apresentou maior título. Na eventualidade do maior título ser apresentado para dois ou mais sorovares, a amostra foi enquadrada como co-aglutinação.

Como um mesmo indivíduo pode apresentar aglutinações para vários antígenos testados, considerou-se o maior título de anticorpos para cada animal, independente do sorovar. Para avaliar a frequência dos sorovares não foi levado em consideração o título de anticorpos.

#### 2.4 Determinação dos fatores associados para brucelose e leptospirose

No momento da colheita das amostras de soro, foi aplicado questionário fechado (Anexo 1), elaborado com base em THRUSFIELD (2004), para a determinação dos fatores associados à leptospirose e brucelose bovina em todas as propriedades integrantes do estudo.

Foram analisadas características individuais do animal testado, como o sexo e a idade, assim categorizada: abaixo de 12 meses, entre 12 e 24 meses ou acima de 24 meses. Também foram obtidas informações referentes ao sistema de criação, com destaque para tamanho do rebanho, criação de outras raças bovinas, aquisição de animais, adoção de quarentena, utilização de pasto em comum com outras propriedades, prática de aluguel de pastos, acesso dos bovinos a áreas alagadiças, prática de abate na fazenda; sistema de reprodução;

presença de touro próprio; ocorrência de abortos nos últimos 12 meses; adoção de vacinas contra leptospirose e brucelose; presença de animais silvestres e de outras espécies de animais domésticos e adoção de manejo superextensivo, para categorizar os bovinos em pastagens nativas com livre acesso à mata e maior contato com possíveis reservatórios silvestres.

## 2.5 Análise estatística

Foi estimada a frequência de animais positivos para a infecção de acordo com as variáveis qualitativas avaliadas. A associação entre essas variáveis e a reação sorológica positiva foi verificada por meio do teste exato de Fisher ( $p < 0,20$ ).

A fim de estabelecer a associação de fatores de risco com a variável resposta: a soropositividade, foi empregada a análise de regressão logística multivariada, comumente usada para a análise de dados em que a variável resposta é dicotômica (binária). Assim, foram criados dois modelos, um para Curraleiros e outro para Pantaneiros.

A partir dos coeficientes dos modelos foram estimados as *odds ratio* dos fatores associados e seus intervalos de confiança. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

## 3 Resultados

Após testar 1.280 amostras de soro de bovinos Curraleiros Pé Duro provenientes de 20 propriedades, por meio de AAT, foram detectados nove animais positivos, fornecendo uma frequência geral de 0,7% para a infecção. Todas as sororeagentes eram fêmeas com idade superior a 24 meses caracterizando frequência de brucelose de 0,83% nesta categoria. Os animais eram oriundos de cinco criatórios do Estado de Goiás e, portanto, a brucelose foi diagnosticada em 25% dos rebanhos da raça Curraleiro Pé Duro. As principais características observadas nos criatórios com bovinos positivos estão listadas no

Quadro 1. Nenhuma das 248 amostras de soro de bovinos Pantaneiros testada mostrou reação ao teste.

QUADRO 1 – Características dos criatórios de bovinos Curraleiros Pé Duro com animais positivos para brucelose

Características	Propriedades				
	Propriedade 1	Propriedade 2	Propriedade 3	Propriedade 4	Propriedade 5
Animais positivos	01	01	03	02	02
Tamanho do rebanho	mais de 100 animais	mais de 100 animais	entre 51-100 animais	mais de 100 animais	mais de 100 animais
Vacina contra brucelose	sim	não	não	sim	não
Compra de animais na propriedade	sim	não	sim	sim	sim
Adoção de quarentena	sim	não se aplica	não	não	não
Pastagem em comum com outras propriedades	não	não	não	não	não
Aluga pastos	não	não	não	não	não
Abate na propriedade	sim	não	não	não	sim
Sistema de reprodução	monta natural	monta natural	monta natural	monta natural	monta natural
Origem do touro	próprio	próprio	próprio	próprio	próprio

Em relação à leptospirose na raça Curraleiro detectaram-se aglutininas anti-*Leptospira* em 573 amostras (44,8%) e para os Pantaneiros em 127 amostras (51,2%). Observou-se que 100% dos criatórios foram positivos para leptospirose para ambas as raças. A frequência da infecção por *Leptospira* spp. em bovinos Curraleiros por Estado foi de 43,8% no Piauí, 44% em Goiás e 51% no Tocantins (Tabela 2). Nos Pantaneiros detectou-se 53% de soropositividade no Mato Grosso e 50% no Mato Grosso do Sul (Tabela 3).

TABELA 2 – Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. no teste de SAM em 1.280 amostras de soro bovino da raça Curraleiro Pé Duro de 20 propriedades nos Estados do Piauí, Goiás e Tocantins

Resultado	Estados					
	Piauí		Goiás		Tocantins	
	n	%	n	%	n	%
Não reagente	234	56,3	396	56,0	77	49,0
Reagente	182	43,8	311	44,0	80	51,0
Total	416	100,0	707	100,0	157	100,0

TABELA 3 – Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. no teste de SAM em 248 amostras de soro bovino da raça Pantaneiro de quatro propriedades nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul

Resultado	Estados			
	Mato Grosso		Mato Grosso do Sul	
	n	%	n	%
Não reagente	46	47,0	75	50,0
Reagente	52	53,0	75	50,0
Total	98	100,0	150	100,0

A frequência de resposta sorológica por sorovar nas duas raças estudadas está apontada na Tabela 4. Em decorrência da frequência elevada de co-aglutinações pelos antígenos Hardjo e Wolffi, este resultado compôs uma categoria separada na análise. Foi possível verificar predominância de resposta ao sorovares Hardjo e Wolffi, elevada ocorrência de co-aglutinações, além de resposta importante ao sorovar Grippotyphosa, principalmente em Pantaneiros (Figuras 1 e 2).

TABELA 4 – Frequência de reações positivas por sorovar de *Leptospira* spp. no teste de SAM em 573 amostras de soro de bovinos Curraleiros Pé Duro e Pantaneiros de 24 propriedades

Sorovar	Raça			
	Curraleiro		Pantaneiro	
	n	%	n	%
Andamana	1	0,2	—	0,0
Australis	4	0,7	—	0,0
Autumnalis	9	1,6	4	3,1
Bratislava	11	1,9	2	1,6
Butembo	4	0,7	2	1,6
Canicola	3	0,5	—	0,0
Castelonis	4	0,7	3	2,4
Copenhageni	5	0,9	—	0,0
Grippotyphosa	43	7,5	25	19,7
Hardjo	141	24,6	33	26,0
Hebdomadis	21	3,7	—	0,0
Icterohaemorrhagiae	16	2,8	—	0,0
Patoc	19	3,3	9	7,1
Pomona	21	3,7	4	3,1
Pyrogenes	8	1,4	1	0,8
Sentot	5	0,9	—	0,0
Shermani	32	5,6	—	0,0
Tarassovi	1	0,2	—	0,0
Wolffi	123	21,4	28	22,0
Co-aglutinação	62	11,0	8	6,3
Co-aglutinação por Hardjo e Wolffi	40	7,0	8	6,3
Total	573	100,0	127	100,0

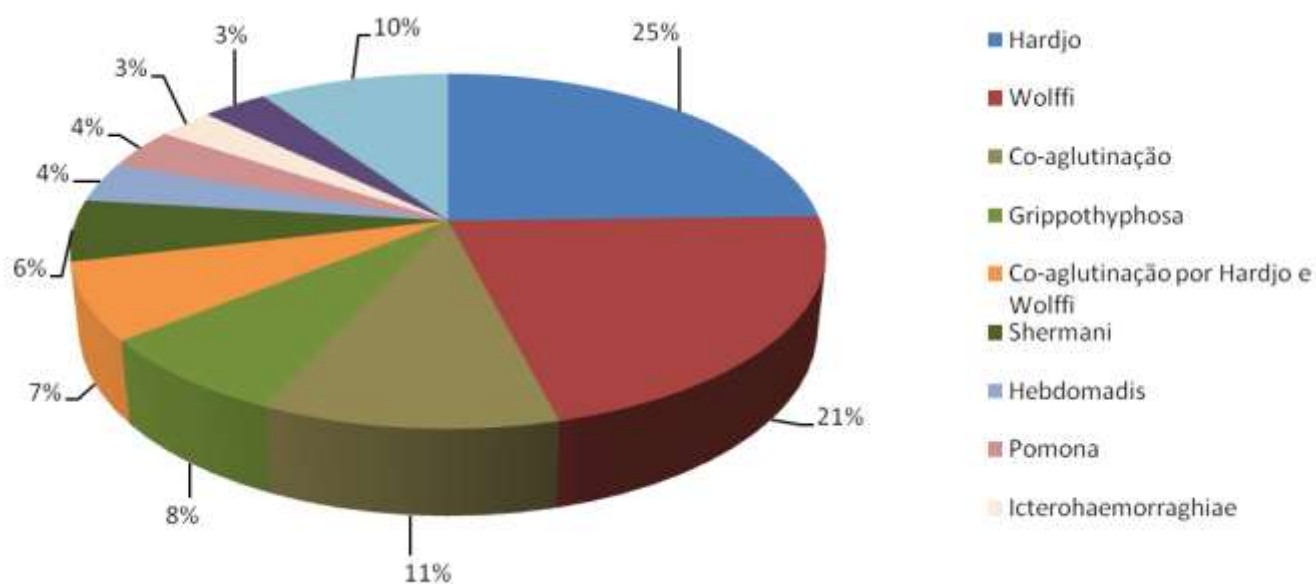


FIGURA 1 – Frequência de reações positivas por sorovar de *Leptospira* spp. em 573 amostras de soro de bovinos Curraleiros Pé Duro reagentes no teste de SAM

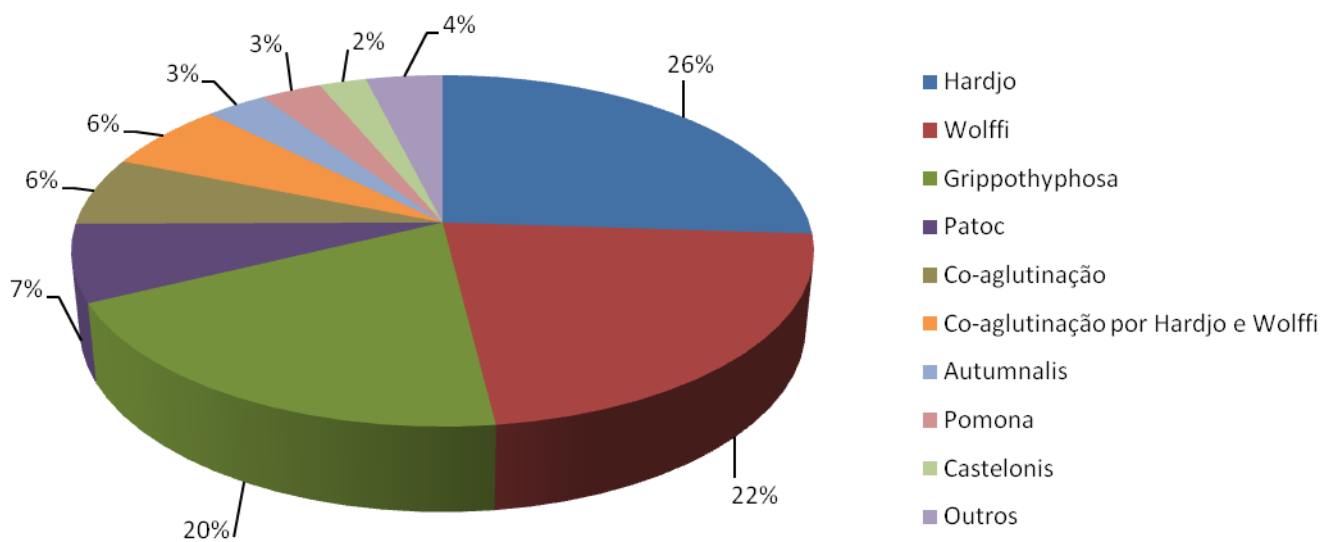


FIGURA 2 - Frequência de reações positivas por sorovar de *Leptospira* spp. em 127 amostras de soro de bovinos Pantaneiros reagentes no teste de SAM

A frequência de títulos de anticorpos anti-*Leptospira* para os principais sorovares está apresentada na Tabela 5. Titulações entre 1:100 e 1:200 foram mais frequentes para a maior parte dos sorovares, contudo titulações mais elevadas também foram observadas, como nas reações para o sorovar Wolffi em ambas as raças.

TABELA 5 – Frequência de títulos de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* para os principais sorovares no teste de SAM em bovinos Curraleiros Pé Duro e Pantaneiros

Curraleiros Sorovar	100		200		400		800		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Grippotyphosa	7	16,3	9	20,9	17	39,5	10	23,3	43	100,0
Hardjo	34	24,1	44	31,2	34	24,1	29	20,6	141	100,0
Hebdomadis	10	47,6	5	23,8	4	19,0	2	9,5	21	100,0
Patoc	12	63,2	4	21,1	2	10,5	1	5,3	19	100,0
Pomona	7	33,3	6	28,6	6	28,6	2	9,5	21	100,0
Shermani	7	21,9	10	31,3	10	31,3	5	15,6	32	100,0
Sentot	4	80,0	1	20,0	–	0,0	–	0,0	5	100,0
Wolffi	11	8,9	32	26,0	39	31,7	41	33,3	123	100,0
Pantaneiros Sorovar	100		200		400		800		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Autumnalis	–	0,0	3	75,0	–	0,0	1	25,0	4	100,0
Castelonis	2	66,7	1	33,3	–	0,0	–	0,0	3	100,0
Grippotyphosa	5	20,0	14	56,0	5	20,0	1	4,0	25	100,0
Hardjo	7	21,2	6	18,2	11	33,3	9	27,3	33	100,0
Patoc	3	33,3	5	55,6	1	11,1	–	0,0	9	100,0
Pomona	–	0,0	2	50,0	–	0,0	2	50,0	4	100,0
Wolffi	5	17,9	8	28,6	9	32,1	6	21,4	28	100,0

A frequência de sororeação para *Leptospira* spp. foi determinada em animais nas três faixas etárias (Tabela 6), revelando diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre a ocorrência de leptospirose nas diferentes idades para as duas raças. Em Curraleiros, animais acima de 24 meses foram os mais acometidos, ao passo que em Pantaneiros bovinos entre 12 e 24 meses apresentaram maior frequência. A ocorrência de reações positivas por sexo está apontada na Tabela

7. Para tal variável foi detectada diferença estatística ( $p < 0,01$ ) na presença de anticorpos contra a infecção apenas em Pantaneiros.

TABELA 6 – Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. no teste de SAM em bovinos das raças Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro de acordo com a faixa etária

Idade / Raça	Leptospirose					
	Não reagente		Reagente		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Curraleiro</b>						
< 12 m	117	71,3	47	28,7	164	100,0
12m -24 m	20	66,7	10	33,3	30	100,0
> 24 m	570	52,5	516	47,5	1.086	100,0
Total	707	55,2	573	44,8	1.280	100,0
<b>Pantaneiro</b>						
< 12 m	54	83,1	11	16,9	65	100,0
12m -24 m	12	34,3	23	65,7	35	100,0
> 24 m	55	37,2	93	62,8	148	100,0
Total	121	48,8	127	51,2	248	100,0

$p < 0,001$  em ambas as raças

TABELA 7 - Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. no teste de SAM em bovinos das raças Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro de acordo com o sexo

Sexo / Raça	Leptospirose					
	Não reagente		Reagente		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Curraleiro</b>						
Macho	153	56,5	118	43,5	271	100,0
Fêmea	554	54,9	455	45,1	1.009	100,0
Total	707	55,2	573	44,8	1.280	100,0
<b>Pantaneiro</b>						
Macho	39	67,2	19	32,8	58	100,0
Fêmea	82	43,2	108	56,8	190	100,0
Total	121	48,8	127	51,2	248	100,0

$p < 0,01$  em bovinos Pantaneiros

A análise das variáveis associadas à soropositividade de bovinos Curraleiros para pelo menos um sorovar, por meio da análise pontual e intervalar da *odds ratio*, identificaram como fatores associados à infecção por *Leptospira interrogans*: acesso à área alagadiça, ocorrência de abortos, vacinação contra leptospirose e prática de abate na propriedade (Tabelas 8 e 9). Já para bovinos Pantaneiros apresentaram relação às variáveis sexo e idade, estando sob maior risco fêmeas na faixa etária entre 12 e 24 meses (Tabelas 10 e 11).

TABELA 8 - Resultado da análise univariada dos possíveis fatores associados à leptospirose, em rebanhos de bovinos Curraleiros Pé Duro, para variáveis relacionadas aos animais e aos rebanhos dos quais fazem parte ( $p < 0,20$ )

Variável	Expostos/focos	Expostos/não focos	p
Idade superior a 24 meses	1086/516	1086/570	<0,001
Rebanhos de até 50 animais	110/57	110/53	0,038
Ingresso de animais	1000/467	1000/533	0,009
Adota quarentena	453/234	453/219	<0,001
Cria outra raça	886/415	886/471	0,028
Acesso a áreas alagadiças	568/300	568/268	<0,001
Ocorrência de abortos na propriedade	447/242	447/205	<0,001
Vacina contra leptospirose	80/68	80/12	<0,001
Pastagem em comum com outra propriedade	110/57	110/53	0,132
Abate na fazenda	553/280	553/273	<0,001

TABELA 9 – Modelo final da regressão logística multivariada de fatores de risco (*odds ratio*) para leptospirose em Curraleiros Pé Duro

Variável	Odds ratio	IC*
Acesso a áreas alagadiças	2,64	1,93 - 3,61
Abate na fazenda	2,40	1,76 - 3,29
Ocorrência de abortos na propriedade	4,06	1,77 - 9,30
Vacina contra leptospirose	6,04	2,83 - 12,89

\* IC: intervalo de confiança

TABELA 10 - Resultado da análise univariada dos fatores associados à leptospirose, em rebanhos de bovinos Pantaneiros, para variáveis relacionadas aos animais e aos rebanhos dos quais fazem parte ( $p < 0,20$ )

Variável	Expostos/focos	Expostos/não focos	p
Animais do sexo feminino	190/108	190/82	0,001
Idade entre 12 e 24 meses	35/23	35/12	<0,001
Não possui touro próprio	15/14	15/1	<0,001
Não há ingresso de animais	15/14	15/1	<0,001
Manejo superextensivo	233/113	233/120	<0,001
Não adota monta natural	15/14	15/1	<0,001

TABELA 11 – Modelo final da regressão logística multivariada de fatores de risco (*odds ratio*) para leptospirose em Pantaneiros

Variável	Odds ratio	IC
Idade entre 12 e 24 meses	18,54	[6,28-54,71]
Fêmeas bovinas	4,34	[2,05-9,20]

\* IC: intervalo de confiança

#### 4 Discussão

Por meio do teste de AAT, seguido de confirmação com SAL + 2-ME, verificou-se frequência de sororeação de 0,7% bovinos Curraleiros. No trabalho de JULIANO (2006) também com essa raça, a frequência da enfermidade foi superior a aqui detectada, com índice de 1,23%. ACYPRESTE et al. (2002), em Goiânia obtiveram 1,74% em rebanhos leiteiros e ROCHA et al. (2009) em estudo mais amplo no Estado de Goiás, encontraram prevalência de 1,36% em rebanhos de corte, 2,55% em rebanhos leiteiros e 4,33% em animais com aptidão produtiva mista. Diferenças no método de amostragem tornam difícil a comparação direta dos resultados, contudo postula-se que a frequência mais baixa detectada neste trabalho possa estar relacionada ao sistema de produção extensivo ou superextensivo adotado nos criatórios de bovinos Curraleiros, o que minimiza a chance de contato com pastagens, água, alimentos e fômites contaminados pelo agente.

Apesar da baixa frequência de animais sororeagentes detectou-se positividade considerável para rebanhos, visto que dentre os 20 criatórios de Curraleiros testados, cinco (25%) possuíam animais positivos, todos se localizavam em Goiás. ACYPRESTE et al. (2002), relataram prevalência de focos de 17,8%, inferior a aqui detectada, em fêmeas bovinas na bacia leiteira de Goiânia. No estudo de ROCHA et al. (2009) no Estado do Goiás o índice de propriedades positivas detectadas foi de 17,5%.

Segundo ROCHA et al. (2009) e GODFROID et al. (2011) a compra de animais infectados é amplamente reportada como o principal fator de introdução de brucelose em rebanhos livres. A aquisição de bovinos sem exigência de testes sorológicos negativos revelou-se como prática comum nos criatórios de bovinos de raças locais visitados. Tal observação associada à baixa adesão à vacinação obrigatória preconizada pelo PNCEBT pode ter contribuído para o elevado índice de rebanhos com animais reagentes à sorologia.

FIORAVANTI et al. (2011) relataram como vantagens de bovinos Curraleiros apontadas pelos criadores, a rusticidade, a resistência a enfermidades, a pequena necessidade de cuidados e os baixos custos de manutenção. Dentre os cinco criatórios de Curraleiros com bovinos sororeagentes neste estudo, em três ainda não se praticava vacinação contra brucelose, apesar de tal medida fazer parte do PNCEBT. Além disso, em três rebanhos eram introduzidos animais sem adoção de quarentena. Diante disso, fica claro que é necessário conscientizar os produtores, pois a falta de valoração econômica e investimentos, associada à falsa ideia de que a resistência dispensa a adoção de vacinas e outras medidas sanitárias, podem comprometer os programas de conservação de bovinos Curraleiros. Conseqüentemente, a intensificação do programa obrigatório de vacinação parece ser uma prioridade, conforme sugerido por ROCHA et al. (2009), com o objetivo de atingir e sustentar cobertura vacinal de bezerras em, pelo menos, 80% do rebanho.

Todos os bovinos Pantaneiros avaliados apresentaram sorologia negativa para brucelose. Segundo JULIANO et al. (2007) o manejo sanitário para brucelose bovina em Núcleos de conservação de bovinos Pantaneiros iniciou-se em 1991, com a vacinação de bezerras e descarte de animais positivos. Estudos citados pelos autores mostram a diminuição da prevalência ao longo dos anos,

caindo de 11,4% em 1990 para 3,78% em 2006. O resultado deste estudo, em que nenhuma amostra testada mostrou reação ao teste, aponta para uma situação de controle da brucelose nos Núcleos de conservação de bovinos Pantaneiros, condição que se respalda nas afirmações de ROCHA et al. (2009) para os quais a vacinação contra brucelose é um dos fatores fundamentais no controle da doença.

Em relação à leptospirose, títulos iguais ou superiores a 100 para um ou mais sorovares foram detectados em 573 bovinos Curraleiros (44,76%). JULIANO (2006) detectou prevalência inferior (31,6%) ao avaliar 569 animais da raça Curraleiro, ao passo que SANTIN (2008) encontrou índices mais elevados (58,6%) dentre os 58 testados. Em amplo estudo desenvolvido em 21 estados brasileiros por FAVERO et al. (2001), o percentual médio de animais reagentes para pelo menos uma variante sorológica de *Leptospira* spp. foi 37,94%. No estrato que incluiu os estados de Piauí, Goiás e Tocantins a média encontrada pelos os autores foi de 49,55%, comparável ao valor (44,76%) detectado para bovinos Curraleiros nos citados estados nesse trabalho. Portanto, a frequência de leptospirose nos bovinos Curraleiros avaliados esteve dentro dos valores esperados.

A frequência de bovinos reagentes para leptospirose em Núcleos de conservação de bovinos Pantaneiros foi de 51,2%. Ao pesquisarem doenças da esfera reprodutiva em Núcleos de conservação da raça, JULIANO et al. (2011) detectaram índice de 30,3% para leptospirose, sendo 11,8% para Fazenda Nhumirim (Embrapa Pantanal) e 55,5% para o Núcleo de conservação de Poconé. Em inquérito sorológico para a infecção em 282 bovinos de corte no Pantanal, TOMICH et al. (2007), encontraram 50,7% de animais positivos, resultados mais próximos aos detectados nos bovinos Pantaneiros deste estudo. Apesar de se tratar de animais de raça distinta, os rebanhos avaliados neste trabalho pertenciam à mesma região em que a endemicidade se mostrou elevada. Segundo citações de VIEIRA et al. (2011) as condições ecológicas do Pantanal são altamente favoráveis à ocorrência da leptospirose bovina, uma vez que o agente sobrevive mais tempo em áreas alagadas e com temperaturas elevadas.

No Brasil a soroprevalência da leptospirose em rebanhos varia de 74% a 100% (FIGUEIREDO et al., 2009). Nas 24 propriedades estudadas foram

detectados bovinos sororeagentes, com positividade em 100% das propriedades de Curraleiros Pé duro e Pantaneiros, indicando comportamento enzoótico da infecção. FAVERO et al. (2001) encontraram prevalência de 84,1% de propriedades com pelo menos um animal reagente. Em alguns Estados a prevalência foi menor (74%) e em outros, semelhante (100%) à obtida nesse estudo. OLIVEIRA et al. (2010) também alertaram para a alta frequência (77,9%) da infecção nos rebanhos estudados no estado da Bahia. Em São Paulo, CASTRO et al. (2008) detectaram 71,8% das propriedades examinadas com pelo menos um bovino soropositivo. Essa situação é corroborada pelos resultados de FIGUEIREDO et al. (2009) que avaliaram prevalência de leptospirose em 178 rebanhos do Mato Grosso do Sul e encontraram positividade em 96,5% rebanhos, semelhante à aqui observada.

Em relação à idade dos bovinos acometidos verificou-se um incremento da prevalência da leptospirose com o aumento da idade, sendo os bezerros menos acometidos do que as outras categorias. Resultados semelhantes foram obtidos por PRESCOTT et al., (1988), ALONSO-ADICOBERRY et al. (2001) e JULIANO (2006). Tais resultados são justificados principalmente pela oportunidade dos animais em terem contato com o agente e ao índice de infecção ambiental. JULIANO (2006), ao estudar rebanhos Curraleiros, ressaltou que o fato desses animais serem criados em regime extensivo, em pastagens com baixa lotação e com fonte de água corrente, deve minimizar o contato entre os hospedeiros susceptíveis e a fonte de infecção, restringindo as possibilidades de disseminação da doença, e por isso animais mais velhos teriam maior oportunidade de se infectarem e apresentarem soropositividade. Nos Curraleiros aqui testados, maior índice de soropositividade foi detectado em bovinos acima de 24 meses. Já no Pantanal, em decorrência de características do bioma, como elevada umidade e diversidade da fauna silvestre, postula-se que em bovinos Pantaneiros o contato com o agente possa acontecer mais precocemente e por isso esses animais apresentaram maior frequência de aglutininas anti-*Leptospira* entre 12 e 24 meses.

As titulações de anticorpos contra Hardjo, sorovar para o qual os bovinos são hospedeiros de manutenção, foram predominantes na titulação 1:200 em Curraleiros e 1:400 em Pantaneiros. Segundo JULIANO et al. (2007) a

ocorrência de títulos de anticorpos em baixas diluições, como aqui detectado, podem indicar que a enfermidade ocorre de forma enzoótica. Para FIGUEIREDO et al. (2009) a resposta sorológica para Hardjo pode ser bastante variável, inclusive no aborto, sendo possível verificar animais soronegativos e outros mostrando altos títulos. No sorovar Wolffi detectou-se predominância de títulos mais elevados, prevalecendo 1:800 em Curraleiros e 1:400 em Pantaneiros. Tais resultados discordam das citações de MARQUES (2008), pois, por se tratar de hospedeiro de manutenção desse sorogrupo titulações acima de 1:800 em bovinos são raras.

Dentre os fatores de risco evidenciados para Curraleiros o acesso dos bovinos a áreas alagadiças, a prática de abate na propriedade e o relato de abortos nos 12 meses que antecederam o estudo, aumentaram em 2,64, 2,40 e 4,06 vezes a chance de infecção, respectivamente. Para FIGUEIREDO et al. (2009) variáveis de manejo são comumente identificadas como possíveis de aumentar o risco de ocorrência de leptospirose. Essas variáveis, apontadas como as mais importantes, estão todas relacionadas à possível dispersão de leptospiras na propriedade. FAINE et al. (1999) ressaltaram que uma vez no ambiente, o agente pode permanecer viável por longos períodos, dependendo das condições climáticas, aumentando de forma significativa a chance de contato e infecção de novo indivíduo susceptível.

Animais provenientes de propriedades em que é adotada a vacinação contra leptospirose revelaram 6,04 vezes mais chances de apresentarem infecção para pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp. Este resultado parece contraditório com a função protetora da vacina, mas, provavelmente, é o resultado da ausência de uma política de vacinação sistemática contra leptospirose. Tal situação também foi evidenciada por ROCHA et al. (2009). Nessas situações, os pecuaristas costumam recorrer a vacinas quando descobrem que o rebanho está acometido por enfermidades da esfera reprodutiva, seja porque ocorreram abortos ou porque os testes diagnósticos foram positivos. Postula-se ainda que a aglomeração de animais para realização da vacinação culmina em maior risco de infecção por favorecer o contato entre bovinos infectados e susceptíveis. Além deste aspecto, deve-se ressaltar que a composição das vacinas comerciais disponíveis no Brasil não abrange a totalidade de sorovares para os quais

detectaram-se resposta e assim, a proteção conferida pelo imunógeno fica comprometida.

As análises das variáveis associadas à soropositividade em bovinos Pantaneiros indicaram que estão sob maior risco fêmeas na faixa etária entre 12 e 24 meses. O sexo aumentou em 4,34 vezes a chance de infecção, enquanto a idade aumentou em 18,54 vezes. Apesar do maior risco atribuído a essa faixa etária, a frequência de soropositividade na categoria acima de 24 meses foi semelhante, com 65,71% e 62,84%, respectivamente. Tal ocorrência foi bastante superior à observada em bovinos de até 12 meses, que apresentaram 16,92% de reagentes. O incremento do risco em animais mais velhos pode ser atribuído à maior possibilidade dos mesmos entrarem em contato com a *Leptospira* spp. JULIANO (2006) ressaltou que animais mantidos em regime extensivo, em pastagens com baixa lotação e com fonte de água corrente, devem ter menor contato com a fonte de infecção, restringindo as possibilidades de disseminação da doença, e por isso animais mais velhos teriam maior oportunidade de se infectarem e apresentarem soropositividade. No presente estudo, em decorrência de características do bioma Pantanal, como elevada umidade e riqueza da fauna silvestre, postula-se que em bovinos Pantaneiros o contato com o agente possa acontecer mais precocemente e por isso estes animais apresentaram mais aglutininas anti-*Leptospira* entre 12 e 24 meses.

O inquérito sorológico nas duas raças apontou como sorovares mais importantes Hardjo e Wolffi. Em bovinos Curraleiros a frequência de anticorpos contra esses sorovares foi 25% e 21% e em Pantaneiros, 26% e 22%, respectivamente. Em rebanhos Curraleiros JULIANO (2006) e SANTIN (2008) também detectaram prevalência nitidamente maior de aglutinações para Hardjo e Wolffi, além de ocorrência significativa dos sorovares Hebdomadis e Grippytyphosa. Da mesma forma, em bovinos Pantaneiros, a maior parte das infecções por *Leptospira* spp. foi atribuída às variantes Hardjo e Wolffi por PELEGRIN et al. (1999). TOMICH et al. (2007) também analisaram, por meio da SAM, soros de bovinos de corte no Pantanal e as citadas sorovariedades foram predominantes.

No estudo de FAVERO et al. (2001) Hardjo e Wolffi foram detectadas como variantes mais prováveis, embora com prevalências distintas, no Mato

Grosso do Sul (51,5% e 24,2%), Mato Grosso (82,35% e 5,88%), Goiás (63,7% e 13%) e Piauí (66,5% e 14,2%), estados nos quais localizavam-se os bovinos de raças crioulas analisados no presente trabalho. Em Minas Gerais ARAÚJO et al. (2005) obtiveram 19,7% de reações positivas ao sorovar Hardjo e 13,2% de Wolffi. Na Bahia OLIVEIRA et al. (2010) detectaram predominância de respostas a Hardjo (34,49%) seguido pelos sorovares Shermani e Wolffi. Para os autores flutuações na sororeatividade no decorrer do tempo podem ser atribuídas a fatores intrínsecos e extrínsecos que modificam a tríade epidemiológica agente, hospedeiro, ambiente.

A predominância do sorovar Hardjo nos rebanhos estudados também está de acordo com os resultados obtidos em estudos em outros países, segundo citações de LEVETT (2001), que afirmou ser a espécie bovina o reservatório preferencial dessa variedade de *Leptospira* spp. Para FIGUEIREDO et al. (2009) muitos animais permanecem como carreadores assintomáticos e são os principais responsáveis pela disseminação do agente no rebanho, por mecanismos de transmissão de bovino a bovino, em dependência de fatores ambientais e de manejo. Assim, segundo LILENBAUM (1996), três medidas de controle simultâneas podem ser praticadas: evitar a introdução de animais no rebanho, salvo quando soronegativos ou tratados com dihidroestreptomicina; tratar os bovinos sororreagentes do rebanho com a mesma droga e fortalecer a imunidade por meio da adoção de vacinas que possuam as soroviedades mais prevalentes na região.

As co-aglutinações, para Hardjo e Wolffi e entre outros diferentes sorovares foram constatadas em 18% dos Curraleiros e em 12% dos Pantaneiros soropositivos. Tais reações podem ser explicadas, como apontado por JULIANO (1999), pela infecção concomitante de vários sorovares de *Leptospira* spp. ou por reações cruzadas dentro de um mesmo sorogrupo. Este evento ocorre em decorrência da estreita afinidade antigênica em um mesmo sorogrupo, como no caso de Hardjo e Wolffi, predispondo a reações paradoxais entre os mesmos na SAM, pela detecção de anticorpos pouco específicos. Em exames sorológicos seriados pode ficar definido um padrão de aglutininas mais específico, pela presença de IgG, como apontado por MARQUES (2008).

Além da presença de sorovariedades de *Leptospira* spp. para as quais o bovino comporta-se como hospedeiro de manutenção, cuja transmissão usualmente ocorre entre indivíduos da espécie, foram detectadas reações acidentais por outros sorovares. Como afirmado por LILENBAUM (1996), a ocorrência de infecções incidentais, causadas por sorovares que não são mantidos nos bovinos, como Australis, Bratislava, Butembo, Castellonis, Grippytyphosa, Copenhageni, Panama, Pyrogenes, Shermani, Andamana e Patoc, deve-se ao contágio indireto, pois animais mantidos a pasto têm acesso livre a lagoas, banhados e matas ciliares, onde existem animais silvestres e roedores que podem atuar como portadores e transmitir estes sorovares para os bovinos.

Em bovinos Curraleiros 8,0% das reações tiveram como sorovar mais provável Grippytyphosa. Em Pantaneiros o índice foi significativamente maior, com 20% das reações. No estudo de JULIANO (2006) variedades de *Leptospira* spp. para as quais os bovinos são hospedeiros incidentais também foram registradas em níveis importantes em Curraleiros, com 10,85% para Grippytyphosa e 12,81% para Hebdomadis.

REILLY (1970) atribuiu à espécie *Procyon lotor*, o guaxinim, o papel de hospedeiro de manutenção de Grippytyphosa. O autor também relatou suscetibilidade moderada de gambás da espécie *Didelphis marsupialis* a esta variedade. RAIZMAN et al. (2009) também detectaram o sorovar Grippytyphosa (36%), seguido por Autumnalis e Hardjo, como os mais importantes em guaxinins. Para os autores muitas doenças têm sido descritas em procionídeos, ressaltando o papel de espécies dessa família na transmissão de doenças para outros animais. JUNK et al. (2006) citaram as famílias Didelphidae e Procyonidae e suas inúmeras espécies, como componentes da fauna do Pantanal. Segundo MARINHO-FILHO et al. (2002), tais mamíferos são abundantes e também estão amplamente distribuídos no Cerrado. Assim, nos biomas de origem de Pantaneiros e Curraleiros encontram-se espécies como mãos-pelada, quatis e gambás, descritos como hospedeiros de sorovares de *Leptospira* spp.

Porcos monteiros, forma feral de suínos domésticos presentes no Pantanal, também apresentaram 5,96% de reações positivas para Grippytyphosa no estudo de FONTANA (2011). Ao avaliar paralelamente bovinos na região, o

autor detectou prevalência de 15,41% para o sorovar, índices comparáveis aos detectados nos bovinos Pantaneiros do presente trabalho, que provavelmente comportaram-se como hospedeiros incidentais, sendo infectados por transmissão indireta.

Em Curraleiros o sorovar Shermani foi responsável por porcentagem importante das infecções (5,6%). No estudo de OLIVEIRA et al. (2010), em fêmeas bovinas na Bahia, resposta para tal sorovar foi detectada como a segunda mais frequente. Segundo revisão desses autores o sorovar foi isolado pela primeira vez de um roedor (*Proechimys semispinosus*) no Panamá, sendo que no Brasil há relato de isolamento desse sorovar em roedores no Mato Grosso. MARINHO-FILHO et al. (2002) destacaram que *Proechimys* spp. são abundantes e estão largamente presentes no Cerrado. AGUIAR et al. (2006) evidenciou Shermani como o terceiro mais frequente em bovinos de Rondônia, precedido apenas por Hardjo e Wolffi.

O sorovar Pomona respondeu por 4% das infecções em Curraleiros e 3% em Pantaneiros. Valores ligeiramente menores foram obtidos por JULIANO (2006), que detectou 2,5% de reações por Pomona em Curraleiros. Resultados semelhantes foram encontrados por FAVERO et al. (2001), pois ainda que com outros índices de prevalência, os autores determinaram que o sorovar, foi o terceiro mais frequente após Hardjo e Wolffi nos estados do Paraná e Minas Gerais. Embora a prevalência por Pomona não tenha sido elevada neste estudo, tal situação deve ser avaliada com critério, visto que nesses casos a frequência de abortos é elevada, podendo chegar a 50%, segundo FIGUEIREDO et al. (2009).

O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) compartilha dos mesmos hábitos biológicos dos ruminantes domésticos no Pantanal, competindo pelos mesmos alimentos e sendo acometido pelas mesmas doenças. Em pesquisas nessa espécie VIEIRA et al. (2011) e PERES et al. (2011) detectaram o sorovar Pomona como responsável pela infecção, na maior parte dos animais positivos. Apesar de não ter sido encontrada na literatura consultada nenhum estudo específico para leptospirose em animais silvestres no Cerrado MARINHO-FILHO et al. (2002) ressaltaram que o veado-campeiro, apesar de raro, também está amplamente distribuído nesse bioma.

Ao avaliar o papel do porco monteiro (*Sus scrofa domesticus*) na cadeia epidemiológica da leptospirose no Pantanal, FONTANA (2011) classificou o sorovar Pomona como segundo em ordem de importância, após o Icterohaemorrhagiae, o mais prevalente. Contudo, por meio de comparações sorológicas a autora concluiu que a espécie representou baixo risco epidemiológico para os rebanhos bovinos da região, visto que esses apresentaram sororreatividade a Hardjo, Tarassovi e Grippotyphosa, variedades distintas dos porcos ferais. Com exceção de Tarassovi, os achados foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho, visto que Hardjo e Grippotyphosa configuraram-se como alguns dos mais importantes sorovares em bovinos Pantaneiros.

Em pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral na região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, GIRIO et al. (2004) observaram reações para os sorovares Pomona (búfalo e ovino), Wolffi (boi baguá), Icterohaemorrhagiae (ovino, veado-campeiro e suínos) e Copenhageni (veado-campeiro e suínos) como mais frequentes. Reações para os sorovares Pomona e Wolffi foram detectados para os bovinos Pantaneiros do presente estudo, ao passo que para os outros dois não foram detectadas aglutinações. Para CASTRO et al. (2008) a transmissão indireta está associada ao contato com o meio ambiente contaminado por leptospiras oriundas de espécies silvestres ou de outras espécies domésticas. Cervídeos, capivaras e outras espécies podem atuar como reservatórios de *Leptospira* spp. para os rebanhos ao encontrar o habitat satisfatório.

Os bovinos Pantaneiros e Curraleiros apresentaram aglutininas anti-leptospira para o sorovar Patoc em respectivamente 7% e 3% das amostras positivas. SILVA et al. (2010) analisaram diversas espécies domésticas e silvestres por meio da SAM e destacaram a marcante reatividade de gambás (*Didelphis albiventris*) ao citado sorovar, presente em 20% das amostras positivas, seguido por Autumnalis e Icterohaemorrhagiae. Segundo os autores gambás podem ser importantes reservatórios de *Leptospira* spp. Não se pode descartar a possível transmissão do agente entre os gambás e os bovinos testados nesse trabalho, visto que segundo MARINHO-FILHO et al. (2002) e JUNK et al. (2006) a espécie está presente no Cerrado e no Pantanal.

GIRIO et al. (2004) ressaltaram que embora alguns trabalhos de pesquisa sobre a leptospirose em animais silvestres tenham sido realizados nas Américas, no Brasil a enfermidade ainda é pouco estudada nas espécies nativas da fauna de cada região, deixando uma possível lacuna no estudo da cadeia epidemiológica, o que dificulta a elaboração de planos estratégicos de controle dessa doença em regiões com grande densidade de animais, matas e rios. Esta informação reveste-se de maior importância quando são consideradas as condições de manejo a que os bovinos de raças locais são submetidos. De forma geral, adota-se manejo extensivo ou superextensivo, com acesso à áreas alagadiças e contato com inúmeras espécies silvestres presentes nas regiões em que são criados. Para LEVETT (2001) regiões com uma rica variedade de fauna, suportam uma variedade maior de sorogrupos do que uma localidade com poucas espécies de hospedeiros. A riqueza de fauna é característica marcante dos biomas que abrigam os bovinos das raças locais aqui estudados.

No Pantanal os bovinos de raças locais apresentaram maior frequência de aglutininas anti-*Lepstospira* para sorovares adaptados ao hospedeiro que se mantém na população por meio do contato direto entre os bovinos Pantaneiros. Estes animais também se comportaram como hospedeiros incidentais para sorovares característicos de espécies silvestres, principalmente Grippotyphosa, Patoc, Autumnalis e Pomona. Analisando trabalhos publicados na fauna silvestre do Pantanal, verifica-se a possível participação de Procionídeos, como o mão-pelada e de porcos monteiros na cadeia epidemiológica da infecção pelo sorovar Grippotyphosa. Para Patoc relata-se alta prevalência em espécies de gambás do gênero *Didelphis*, bastante difundido em toda região, ao passo que Pomona relaciona-se a porcos monteiros, búfalos, veados campeiros e quatis.

Os resultados deste estudo sugerem que apesar dos próprios bovinos serem os principais transmissores de leptospirosas, a fauna silvestre também participa do ciclo da leptospirose nos bovinos Curraleiros no Cerrado. Animais sororeagentes para Grippotyphosa, Shermani, Patoc, Pomona e Hebdomadis teriam sua ocorrência dependente de espécies da fauna local e de contatos esporádicos dos bovinos com esses reservatórios, e, por isso, foram detectados com menor frequência do que Hardjo e Wolffi. Os estudos de leptospirose aqui discutidos são, em sua maioria, publicados para animais silvestres no Pantanal,

contudo tais espécies também fazem parte da fauna do Cerrado e, portanto acredita-se que gambás, mãos-pelada, quatis, pequenos roedores e veados campeiros também estejam envolvidos na epidemiologia da infecção neste bioma. Pesquisas em mamíferos do Cerrado seriam fundamentais na elucidação do impacto destas populações na epidemiologia da leptospirose bovina em sistemas de produção pecuária extensiva e superextensiva, característicos de rebanhos Curraleiros Pé Duro.

## 5 Conclusões

A brucelose apresenta baixa frequência em bovinos Curraleiros Pé Duro e está controlada em bovinos Pantaneiros.

Em rebanhos de bovinos Curraleiros e Pantaneiros a frequência de animais sororeagentes para leptospirose é elevada, indicando ampla disseminação da infecção nos Núcleos de criação de bovinos de raças localmente adaptadas. Nas duas raças os sorovares mais prevalentes foram Hardjo e Wolffi reforçando o papel dos bovinos como fonte de infecção no rebanho. A ocorrência de positividade para sorovares como Grippytyphosa, Patoc e Pomona em Pantaneiros e Grippytyphosa, Shermani, Pomona e Hebdomadis em Curraleiros sugere a participação da fauna local na epidemiologia da leptospirose bovina nos Núcleos de conservação das raças.

Acesso dos bovinos a áreas alagadiças, ocorrência de abortos, vacinação contra leptospirose e prática de abate na propriedade constituem risco para ocorrência da infecção em Curraleiros. Em bovinos Pantaneiros estão sob maior risco as fêmeas enquadradas na faixa etária entre 12 e 24 meses.

## Referências

1. ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis e enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**, v. 1, 3.ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2001. 398 p.
2. ACYPRESTE, C. V.; SILVA, L. A. F.; MESQUITA, A. J. et al. Diagnóstico da frequência da brucelose bovina em vacas e lactação na bacia leiteira de Goiânia pelas provas do anel de leite e rosa bengala. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, p.59-65, 2002.
3. ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 287–296, 2010.
4. AGUIAR, D. M.; GENNARI, S. M.; CAVALCANTE, G. T.; LABRUNA, M. B.; VASCONCELLOS, S. A.; RODRIGUES, A. A. R.; MORAES, Z. M.; CAMARGO, L. M. A. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 102-104, abr./jun., 2006.
5. ALONSO-ADICOBERRY, C.; GARCIA-PEÑA, E. J.; PEREIRA-BUENO, J.; COSTAS, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.52, p.109-117, 2001.
6. ARAÚJO, V. E. M.; NAVEDA, L. A. B.; SILVA, J. A.; CONTRERAS, R. L. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n. 4, p.430-435, 2005.
7. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.
8. CASTRO, V.; AZEVEDO, S. S.; GOTTI, T. B.; BATISTA, C. S. A.; GENTILI, J.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, S. E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade

- reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 3-11, jan./mar. 2008.
9. FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2.ed. Melbourne: MedSci, 1999. 272p.
  10. FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.
  11. FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P., FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 375-381, mai. 2009.
  12. FIORAVANTI, M. C. S., JULIANO, R. S.; COSTA, G. L.; ABUD, L. J.; CARDOSO, W. S.; CARPIO, M. G.; COSTA, M. F. O. Conservación del bovino Curraleiro: cuantificación del censo y caracterización de los criadores. **Animal Genetic Resources**, v. 48, p. 109–116, 2011.
  13. FONTANA, I. **Avaliação do papel do porco monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do pantanal sul-mato-grossense**. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
  14. GIRIO, R. J, S.; PEREIRA, F. L. G.; FILHO, M. M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 165-169, 2004.
  15. GODFROID J.; SCHOLZ H. C.; BARBIER T.; NICOLAS C.; WATTIAU P.; FRETIN D.; WHATMORE A. M.; CLOECKAERT A.; BLASCO J. M.; MORIYON I.; SAEGERMAN C.; MUMA J. B.; AL DAHOUK S.; NEUBAUER

- H.; LETESSON J. J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. **Preventive Veterinary Medicine**. Fort Collins. n.102 p.118–131, 2011
16. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas do Brasil**. 2004. [online] Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas\\_e\\_Mapas/Mapas\\_Murais/](ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/). Acesso em: 10 jul. 2012.
  17. JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça currealeiro**. 2006, 125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiás.
  18. JULIANO, R. S. **Estudo da prevalência e aspectos epizootiológicos da leptospirose bovina, no bebanho de fêmeas mestiças produtoras de leite na microregião de Goiânia – GO**. 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
  19. JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; ABREU, U. G. P.; SERENO, J. R. B.; JACOMINI, L. A. Situação Sanitária de Bovinos Pantaneiros: Brucelose e Tuberculose. **Circular Técnica**, Corumbá: Embrapa Pantanal, n. 70, p.1–4. 2007.
  20. JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; SERENO, J. R. B.; ABREU, U. G. P.; JAYME, V. S.; SILVA, A. C.; MACHADO, R. Z.; BRITTO, W. M. E. D.; ALFIERI, A. A.; SANTOS, S. A. Aspectos Sanitários dos Núcleos de Conservação *in situ* de Bovinos Pantaneiros. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Corumbá: Embrapa Pantanal, n. 103, p.1–15, 2011. [online] Disponível em: <http://www.cpap.Embrapa.br/publicacoes/online/BP103.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2012.
  21. JUNK, W. J.; CUNHA, C. N.; WANTZEN, K. M.; PETERMANN, P.; STRÜSSMANN, C.; MARQUES, M. I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Sciences**, v. 68, p.278-309, 2006.
  22. LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 296-326, apr. 2001.

23. LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 9-13, 1996.
24. MARINHO-FILHO, J.; RODRIGUES, F. H. G.; JUAREZ, K. M. The Cerrado Mammals: Diversity, Ecology, and Natural History. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University Press. 2002. cap. 14, p. 266-284.
25. MARQUES, A. E. **Prevalência de anticorpos anti-leptospira spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de goiás**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
26. MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; BRITO, W. M.; ELSNER D.; FIORAVANTI, M. C. S.; PARREIRA, I. M.; JAYME, V. S. Prevalência de anticorpos anti-*leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 607-617, jul/set. 2010.
27. OIE. Bovine Leptospirosis. In: **Terrestrial Manual**. [online]. 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> Acesso em 27 set. 2011
28. OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n. 5, p. 398-402, mai. 2010.
29. PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; MAZZA, M. C. M.; LEITE, R. C. Doenças da reprodução e conservação genética: levantamento no núcleo de conservação do bovino pantaneiro. **Embrapa Pantanal - Comunicado Técnico**, Corumbá, n. 21, p. 1– 4. 1997.
30. PELLEGRIN, A. O.; GUIMARÃES, P. H. S.; SERENO, J. R. B.; FIGUEIREDO, J. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. **Embrapa Pantanal - Comunicado Técnico**, Corumbá, n. 22, p. 1– 9. 1999.

31. PÉRES, I. A. H. F. S.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAES, Z. M.; OLIVEIRA, C. E.; ROSINHA, G. M. S.; SOARES, C. O.; TOMAS, W. M.; PELLEGRIN, A. O. Variáveis de risco associadas à ocorrência da leptospirose e às taxas reprodutivas em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) na região da Nhecolândia, Corumbá, MS, Brasil. **Biológico**, São Paulo, v. 73, suplemento 2, p. 47, 2011.
32. PRESCOTT, J. F.; MILLER, R. B.; NICHOLSON, V. M.; MARTIN, S. W.; LESNICK, T. Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontário. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, n. 52, p. 210-215, 1988.
33. R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 06 mai. 2012.
34. RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737p.
35. RAIZMAN, E. A.; DHARMARAJAN, G.; BEASLEY, J. C.; WU, C. C.; POGRANICHNIY, R. M.; RHODES JR., O. E. Serologic Survey for Selected Infectious Diseases in Raccoons (*Procyon lotor*) in Indiana, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 45, n. 2, p. 531–536, 2009.
36. REILLY, J. R. The susceptibility of five species of wild animals to experimental infection with *Leptospira grippotyphosa*. **Journal of Wildlife Diseases**. Ames, v. 6, p.289-294, 1970.
37. ROCHA, W. V.; GONÇALVES, V. S. P.; COELHO, C. G. N. F. L.; BRITO, W. M. E. D.; DIAS, R. A.; DELPHINO, M. K. V. C.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R.; BRITO, L. A. B. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 27-34, 2009.
38. SANTIN, A. P. I. **Perfil sanitário de bovinos da raça Curraleiro frente a enfermidades de importância econômica**. 2008. 78 f. Tese (Doutorado

em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

39. SILVA, F. J.; MATHIAS, L. A.; MAGAJEVSKI, F. S.; WERTHER, K.; ASSIS, N. A.; GIRIO, R. J. S. Anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais domésticos e silvestres presentes no *Campus* Universitário da FCAV, Unesp, Jaboticabal/SP **ARS Veterinária**. Jaboticabal, v.26, n.01, p.17-25, 2010.
40. TOMICH, R. G. P.; BOMFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Leptospirosis serosurvey in bovines from Brazilian Pantanal using Igg Elisa with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n. 38, p. 674-680, 2007.
41. TRHUSFIELD, M. V. **Epidemiologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2004. 556 p.
42. VIEIRA, A.; ROSINHA, G. M. S.; OLIVEIRA, C. E. O.; VASCONCELLOS, S. A.; LIMA-BORGES, P. A.; TOMÁS, W. M.; MOURÃO, G. M.; LACERDA, A. C. R.; SOARES C. O.; ARAÚJO, F. R.; PIOVEZAN, U.; ZUCCO, C. A.; PELLEGRIN, A. O. Survey of *Leptospira* spp in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Pantanal wetlands of the state of Mato Grosso do Sul, Brazil by serology and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, n.6, p. 2011.

### **CAPÍTULO 3 – TESTES SOROLÓGICOS E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NA IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÕES POR *Brucella* spp. E *Leptospira* spp. EM BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ DURO**

#### **Resumo**

Foram empregados métodos sorológicos e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de infecção por *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em bovinos da raça Curraleiro Pé Duro, para avaliar a concordância dos resultados de tais testes. A técnica sorológica empregada para detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus* foi a soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado (AAT) e confirmação pelas provas de soroaglutinação lenta (SAL) e do 2-mercaptoetanol (2-ME) e para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi adotada a soroaglutinação microscópica (SAM). Para a PCR empregou-se o DNA total extraído do sangue dos bovinos. Na identificação da infecção por *Brucella* spp. os testes foram aplicados em amostras de 159 bovinos. Nove amostras foram positivas à sorologia e destas três também foram positivas na PCR. 150 soros bovinos não aglutinaram quando empregado o AAT, em 141 desses bovinos não foi detectado DNA da bactéria e em nove a PCR foi positiva. Para *Leptospira* spp. as técnicas foram empregadas em espécimes clínicos de 267 animais. Dos 133 bovinos reagentes na SAM, dois também foram positivos na PCR. Em 134 animais não foram detectados anticorpos anti-*Leptospira* spp., dentre estes em 133 não foi detectado DNA do agente no sangue, ao passo que em um a PCR foi positiva. Conclui-se que a concordância dos resultados obtidos pela sorologia e PCR na identificação da infecção por *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. foi fraca, o que reforça a ideia de que o diagnóstico é mais confiável quando se emprega mais de um método.

**Palavras-chave:** Brucelose, concordância, diagnóstico, leptospirose.

## SEROLOGICAL TESTS AND POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) IN THE IDENTIFICATION OF INFECTIONS BY *Brucella* spp. E *Leptospira* spp IN CATTLE OF CURRALEIRO “PÉ-DURO” BREED

### Abstract

We used serological methods and polymerase chain reaction (PCR) for detecting infection by *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. in Curraleiro “pé-duro” cattle, and for evaluating the concordance of the tests results. We employed buffered acidified antigen agglutination test (AAT) for the detection of antibodies against *Brucella abortus* and the evidence of agglutination test (SAL) and 2-mercaptoethanol (2-ME) for confirmation ,and the microscopic agglutination test (SAM) for detection of anti-*Leptospira* spp.. We used the total DNA extracted from the blood of the animals for PCR. For detection of infection by *Brucella* spp. the tests were applied to samples from 159 animals. Nine samples were positive to serology and of these three were positive on PCR. Of the total samples, 150 bovine serum did not agglutinate when we used the AAT, from these 141 presented no bacteria's DNA, and nine had positive results on PCR. For the detection of *Leptospira* spp. the techniques were employed in 267 animals, from these, 133 animals were reagents in SAM and two were positive in PCR. Anti-*Leptospira* spp antibodies were not detected in 134 animals, of these, 133 did not present the DNA of the agent in the blood, whereas one was positive in PCR. We concluded that the correlation of results obtained by serology and PCR to identify infection by *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. was weak, which reinforces the idea that the diagnosis is more reliable when employing more than one method.

**Keywords:** Brucellosis, concordance, diagnosis, leptospirosis

## 1 Introdução

A brucelose ainda é um dos principais problemas sanitários do rebanho bovino brasileiro. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento (MAPA) em 2001, a fim de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal. Segundo o PNCEBT o diagnóstico de rebanho da brucelose bovina deve ser obtido por meio de provas sorológicas, empregando-se como teste de triagem o antígeno acidificado tamponado (AAT), seguido de confirmação pela combinação das provas de soroaglutinação lenta (SAL) e do 2-mercaptoetanol (2-ME) (BRASIL, 2006).

De acordo com citações de MEIRELLES-BARTOLI & MATHIAS (2010) em estudos epidemiológicos de brucelose em populações bovinas o AAT revela boa sensibilidade, rapidez e simplicidade de execução, porém animais vacinados com amostras B-19 podem apresentar reações falso-positivas. Provas confirmatórias de maior especificidade devem ser realizadas para evitar o sacrifício de animais negativos. O 2-ME caracteriza-se por sua eficácia, contudo há possibilidade de resultados falso-negativos e de menor sensibilidade para animais recém-infectados, além de constituir-se em um teste mais laborioso (NIELSEN, 2002).

Técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm-se mostrado valiosas para detecção de DNA, caracterizando-se em alternativa promissora para o diagnóstico de brucelose. Para MUKHERJEE et al. (2007) PCRs gênero específicos são adequados e de fácil execução para diagnóstico da brucelose bovina em amostras de campo. ASAAD & ALQAHTANI (2012) afirmaram que tais métodos são mais adequados para diagnóstico clínico de casos agudos da infecção, haja vista que em casos crônicos a carga bacteriana na corrente sanguínea é baixa.

A PCR para pesquisa de *Brucella abortus* tem sido aplicado a diversos espécimes clínicos de bovinos, tais como tecidos, leite, sêmen e sangue (BRICKER, 2002). O' LEARY et al. (2006) testaram diferentes *primers* para detecção de *Brucella* spp. em amostras sanguíneas de bovinos sororeagentes e não detectaram o agente em tais condições. MUKHERJEE et al. (2007) também empregaram esta técnica no mesmo espécime clínico e obtiveram bons

resultados no diagnóstico de brucelose em animais com diferentes resultados sorológicos. YU & NIELSEN (2010) citaram que apesar de serem frequentemente empregadas na PCR, amostras sanguíneas possuem substâncias inibidoras que interferem nos resultados do teste e recomendam seu o tratamento a fim de aumentar a sensibilidade da técnica.

Diversas regiões do genoma da bactéria têm sido empregadas em ensaios de PCR. BAILY et al. (2002) desenvolveram um ensaio para detecção de sequência do gene *BCSP31* que codifica proteína antigênica de membrana externa de 31kDa, de função desconhecida, conservada em todas as espécies do gênero *Brucella*, com exceção de *Brucella ovis*. BRICKER (2002) afirmou que em vários estudos o ensaio revelou-se robusto, sensível e específico. Foram encontrados resultados falso-positivos apenas para *Ochrobactrum anthropi* biótipo D, que consiste em microrganismo geneticamente relacionado a *Brucella* spp.

A leptospirose é uma zoonose bacteriana causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, com distribuição geográfica cosmopolita. Ocorre principalmente em países de clima tropical e subtropical, devido à maior sobrevivência da bactéria em ambientes úmidos, o que aumenta o risco de exposição e contaminação de animais susceptíveis e seres humanos (OLIVEIRA et al., 2010).

O diagnóstico sorológico é o método mais amplamente empregado na detecção da infecção. Todavia é necessário um período de oito a dez dias após o aparecimento dos sintomas para obtenção de resposta humoral (MERIEN et al., 1995), o que retarda a detecção de animais reagentes. Dentre os testes disponíveis, a soroaglutinação microscópica (SAM) tem como principal vantagem ser específica para sorovares ou ao menos sorogrupos, sem, contudo, distinguir entre anticorpos vacinais ou oriundos de infecção. A sensibilidade e a especificidade do teste são descritas como elevadas e tais características permitiram que o teste fosse considerado como método de referência para os inquéritos soroepidemiológicos. Como desvantagens podem ser citadas a complexidade do teste e a necessidade de manutenção de leptospirosas vivas como antígenos (LEVETT, 2001; HIGGINS, 2004; ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

Técnicas de biologia molecular também vêm sendo empregadas na pesquisa de leptospirosas no sêmen, urina e outros espécimes clínicos. Para

MERIEN et al. (1995) a PCR é útil para o diagnóstico da enfermidade nos primeiros dez dias, sobretudo quando a expressão clínica da doença pode ser bastante confusa. Resultados obtidos por BROWN et al. (1995), LEVETT et al. (2005) e HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al. (2011) apontaram para o valor deste método na fase aguda da leptospirose, sobretudo quando os anticorpos ainda não podem ser detectados. GUMUSSOY et al. (2009) testaram a PCR em sangue e urina de bovinos com suspeita de infecção por *Leptospira* spp. e conseguiram detectar o agente apenas na urina em decorrência da curta fase de leptospiremia.

LEVETT et al. (2005) e STODDARD et al. (2009) desenvolveram ensaios de PCR com *primers* que tiveram como alvo sequencia do gene lipL32 responsável pela síntese de lipoproteína de importância antigênica em leptospiros patogênicas. Segundo os autores estudos com amostras clínicas devem ser conduzidos a fim de determinar os melhores espécimes coletados em diferentes momentos do curso da doença, considerando que vários relatos mostram que a bactéria estará presente no sangue apenas na primeira semana após início dos sintomas.

Considerando a rapidez e a facilidade de execução da PCR, o objetivo deste estudo foi detectar a infecção por *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em bovinos empregando técnicas sorológicas e PCR convencional a fim de verificar a concordância entre os resultados destes testes.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Amostras**

Foram empregadas amostras oriundas de um banco de espécimes clínicos de bovinos da raça Curraleiro, colhidas por ocasião de visitas de pesquisadores a propriedades, em atividades da Rede Pró-Centro Oeste, relacionadas ao projeto “Caracterização, conservação e uso das raças bovinas locais brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro”.

Foram utilizadas amostras de bovinos provenientes de onze rebanhos da raça Curraleiro. Para o diagnóstico de brucelose foram testados espécimes clínicos de 159 animais e para leptospirose, amostras de 267 indivíduos.

Para a colheita de sangue procedeu-se punção da veia jugular, empregando tubos esterilizados do tipo *vacutainer*, com e sem anticoagulante para obtenção de sangue não coagulado e de soro sanguíneo. As amostras foram remetidas em caixas isotérmicas contendo bolsas de gelo reciclável e armazenadas em freezer a -18°C no Laboratório Multiusuário de Pós-Graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

## 2.2 Técnicas sorológicas

Para detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus* foi realizada a prova de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado (AAT, Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar, Curitiba, Paraná), seguindo a recomendação do MAPA (BRASIL, 2006). Esta técnica baseia-se na adição em placa de 30 µL de antígeno a 30 µL de soro a ser testado, seguida de agitação suave durante quatro minutos. A leitura é feita sob luz indireta e a reação positiva baseia-se na presença de grumos. Os soros reagentes foram encaminhados ao órgão oficial, Laboratório de Análise e Diagnóstico Veterinário (LABVET), para submissão ao teste confirmatório pela combinação das provas de soroaglutinação lenta (SAL) e do 2-mercaptoetanol (2-ME).

Para o diagnóstico de leptospirose empregou-se a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). A metodologia e interpretação adotadas foram aquelas descritas no *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* (OIE, 2009). Esta técnica baseia-se na adição de soro suspeito do animal em diluições crescentes a culturas de diversas sorovariedades de *Leptospira* spp. mantidas em laboratório, cultivadas em meios especiais. Empregou-se uma coleção de 19 sorovares de *Leptospira* spp. que compõe a coleção de culturas vivas mantidas no Laboratório de leptospirose da EVZ/UFG, onde a sorologia foi realizada. Foram testados soros frente aos sorovares Andamana, Australis, Autumnalis, Bratislava, Butembo, Canicola, Castelonis,

Copenhageni, Grippothyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sentot, Shermani, Tarassovi e Wolffi.

Na etapa de triagem os soros que apresentaram 50% ou mais de leptospiros aglutinadas, considerando os respectivos controles, foram submetidos a uma segunda prova para titulação de anticorpos com os antígenos identificados como reagentes para determinação das amostras positivas e identificação do provável sorovar infectante, sendo consideradas positivas amostras que apresentaram anticorpos aglutinantes em uma diluição mínima de 1:100.

### 2.3 Extração de DNA total

O material escolhido para realização da técnica de PCR foi o sangue. Adotou-se o protocolo de extração de DNA total desenvolvido por ARAÚJO et al. (2009). Para tanto foram utilizados 350 µl de sangue, adicionando-se 500 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 20%, seguido de homogeneização em vórtex e incubação a 65 °C por 6 minutos. Posteriormente foram adicionados 400 µl de clorofórmio seguindo-se agitação vigorosa em vórtex. Acrescentaram-se 300 µl de solução de precipitação proteica (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial e água), procedendo-se nova agitação em vórtex. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi colhido e tratado com 1,0 mL de etanol absoluto refrigerado e, em seguida, homogeneizado por inversão para que o material sólido fosse precipitado. As amostras foram armazenadas a - 20 °C durante a noite e em seguida centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* formado acrescentou-se 1,0 mL de etanol 70% refrigerado, logo após centrifugou-se por 2 minutos a 10000 rpm e o descartando o sobrenadante. Centrifugou-se novamente por 1 minuto e retirou-se o resíduo de etanol. O pellet foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µl de água livre de nucleases por meio de homogeneização lenta. As amostras foram incubadas a 65 °C por 10 minutos para completa solubilização do sedimento.

Após extração, todas as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop* ND-1000 (Thermo Scientific®) e submetidas a

eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *Sybr Safe* (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies) para visualização.

#### 2.4 Amplificação dos genes pela PCR

Para pesquisa de *Brucella* empregou-se o par de oligonucleotídeos desenhado por BAILY et al. (1992) para amplificação de um produto de aproximadamente 223 pares de bases, que corresponde a uma região do gene *BCSP31*, que se mostrou conservada em todas as espécies de *Brucella* examinadas. Empregaram-se os oligonucleotídeos B4 (forward): 5' - TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA - 3' e B5 (reverse): 5'- CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG- 3'.

O par de oligonucleotídeos utilizado para detecção de *Leptospira* spp. foi sintetizado segundo STODDART et al. (2009) para amplificação de um produto de aproximadamente 242 pares de bases, que corresponde a uma região conservada do gene *lipL32* de leptospiros patogênicas. Os oligonucleotídeos utilizados foram o *lipL32-45F* (forward): 5' - AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG - 3', e o oligonucleotídeo *lipL32-286R* (reverse): 5'- GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT - 3'.

Para ambos os patógenos, após a diluição das amostras extraídas estas foram submetidas à PCR. O mix foi preparado com 12,5 µL de água ultrapura (Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies), 2 µL de solução tampão de PCR 10x (200 mM Tris-Hcl com pH 8.4 e 500 mM KCl) (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies), 0,6 µL de cloreto de magnésio a 1.5 mM (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies), 1 µL de cada oligonucleotídeos a 0.25pmol (*LipL32-45F/LipL32-286R*, para *Leptospira* sp. e *BCPS31F/BCPS31R* para *Brucella* sp.), 0,6 µL de solução de dNTPs (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies) e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies).

Do mix preparado, foi aliquoteado 18µL para cada microtubo de PCR e adicionado 2µL do produto da extração de DNA a 50ng/µL, ou 1µL do produto de extração a 100ng/µL. O controle positivo utilizado para *Leptospira* spp foi uma

cepa da sorovariedade Hardjo bovis. Já para verificação de DNA de *Brucella* spp, empregou-se a cepa S2308 de *Brucella abortus*.

Na reação de PCR de leptospirose, para amplificação do fragmento de 242 pares de bases pelo oligonucleotídeo LipL32 foi utilizado termociclador (Eppendorf mastercycler gradient<sup>®</sup>) e a adaptação do protocolo de amplificação de STODDART et al. (2009) consistiu em 95 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (95 °C por 1 minuto, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto), depois a reação foi interrompida a 72 °C por 10 minutos e resfriada para 4 °C por tempo indeterminado. As amostras amplificadas foram guardadas em refrigerador até o momento da eletroforese.

A reação de PCR para amplificação do fragmento de 223 pares de bases pelo *primer* BCPS31 foi realizada em termociclador (Eppendorf mastercycler gradient<sup>®</sup>) e o protocolo de amplificação consistiu em 94 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação (94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 45 segundos), depois a reação foi interrompida a 72 °C por 10 minutos e resfriada para 4 °C por tempo indeterminado, segundo protocolo descrito por NAVARRO et al. (2002). As amostras amplificadas foram guardadas em refrigerador até o momento da eletroforese.

A eletroforese foi realizada após a PCR, utilizando-se gel de agarose na concentração de 0,8% para a visualização do fragmento de 242 pares de bases amplificado do gene *lipL32* de *Leptospira* spp. e do fragmento de 223 pares de bases do gene BCPS31 do gênero *Brucella*. Utilizou-se como tampão de corrida o TBE 1X (100mL de Tris-EDTA borato diluído em 900 mL de água destilada).

No gel de agarose foram aplicados 10 µL de cada amostra, previamente homogeneizadas com 2 µL de tampão de corrida em cada uma. A voltagem média da eletroforese foi de 90 Volts. O tampão era preparado no próprio laboratório a partir da mistura de 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xileno cianol, 30% de glicerol e 7 mL de água destilada.

Após a eletroforese, os géis de agarose foram submersos em solução contendo SYBR<sup>®</sup> Safe (Life Technologies) e TBE (Tris-EDTA borato), na proporção de 8 µL do corante para 400 mL de TBE 1X.

### 3 Resultados

Das amostras dos 159 bovinos testados para o diagnóstico de brucelose bovina, nove foram positivos na sorologia e destes, três também positivos na PCR. Quanto aos 150 bovinos não reagentes na sorologia, nove apresentaram PCR positivo (Tabela 1).

TABELA 1 – Resultados do teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) e do teste do antígeno acidificado tamponado com confirmação pela combinação de soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol (AAT + (SAL+2-ME)) para detecção da infecção por *Brucella* spp em bovinos da raça Curraleiro Pé Duro

PCR Brucelose	AAT + (SAL+2ME)		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	141	6	147
Positivo	9	3	12
Total	150	9	159

Para o diagnóstico de leptospirose bovina foram testados 267 animais. Dentre os 133 reagentes na SAM, 131 foram negativos na PCR e apenas dois apresentaram-se positivos, ao passo que dentre os 134 animais não reagentes, um revelou-se positivo na PCR (Tabela 2).

TABELA 2 – Resultados do teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) e do teste de soroaglutinação microscópica (SAM) para detecção da infecção por *Leptospira* spp em bovinos da raça Curraleiro Pé Duro

PCR Leptospirose	SAM		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	133	131	264
Positivo	1	2	3
Total	134	133	267

## 4 Discussão

Ao observar os resultados da PCR para *Brucella* spp. e dos testes sorológicos nota-se pequena concordância entre os mesmos. Em apenas 33,3% (3/9) dos bovinos sororeagentes foram obtidas PCRs positivas. O'LEARY et al. (2006) não conseguiram encontrar a *Brucella* spp. ao utilizarem a técnica molecular em amostras sanguíneas de bovinos positivos na sorologia. Para os autores PCRs negativas na presença de resposta sorológica consistem em fato plenamente justificável, pois quando anticorpos já estão presentes é provável que a *Brucella* tenha deixado a corrente circulatória ou esteja em quantidade muito pequena para ser detectada. Além disso, quando se emprega sangue como espécime clínico, a presença de grandes quantidades de DNA genômico bovino pode exercer efeito inibitório na prova. No presente estudo, por tratar-se de um banco de amostras, a fase clínica em que os bovinos se encontravam não era conhecida. Postula-se ainda que a possível presença de agentes inibidores também pode ter contribuído para a falha na detecção de *Brucella* spp em bovinos sororeagentes.

MUKHERJEE et al. (2007) também obtiveram fraca concordância, à exemplo da encontrada no presente estudo, entre sorologia pelo ELISA e PCR convencional com os *primers* desenvolvidos por BAILY et al. (2002). Os autores confirmaram a sensibilidade especificidade dos *primers* em DNA genômico de *Brucella* spp. Contudo, a PCR em sangue de bovinos oriundos de rebanhos positivos, não foi hábil em detectar 6,8% (6/87) das amostras de animais positivos no ELISA. Neste trabalho não foi possível obter confirmação pela PCR em 66,6% (6/9) dos indivíduos positivos na sorologia.

No trabalho de MUKHERJEE et al. (2007) foram detectados 47% (24/51) de animais soronegativos como positivos na PCR. No presente estudo tal fato ocorreu em 6% das amostras. É possível que os bovinos soronegativos fossem recém-infectados e ainda não apresentassem anticorpos ou a PCR seja falso-positivo em decorrência de reações cruzadas com *Ochrobactrum anthropi*. ILHAN et al. (2008) também obtiveram reações de PCR positivas em ovelhas soronegativas. Estes resultados apontam para a importância de se empregar mais

de um tipo método de diagnóstico para detecção de animais positivos para brucelose, especialmente com fins epidemiológicos.

Estudos realizados por AL-AJLAN et al. (2011) e ASAAD & ALQAHTANI (2012) demonstraram a eficácia dos primers B4 e B5 na detecção de *Brucella* spp em amostras sanguíneas. Contudo a falta de padronização e uniformidade na PCR está entre os fatores que podem ter levado a baixa concordância entre os resultados dos métodos aqui empregados. Assim sugere-se que sejam avaliados o espécime clínico ideal e o método de extração em estudos mais amplos.

Os primers lipL32 empregados no presente trabalho foram desenvolvidos e testados por STODDARD et al. (2009) em PCR em tempo real. O teste foi hábil em detectar a bactéria no soro de dois entre três pacientes fatais em um surto de leptospirose humana, antes da soroconversão. Os *primers* escolhidos neste estudo mostraram-se sensíveis e altamente específicos, sobretudo quando testados na fase inicial da infecção.

GUMUSSOY et al. (2009) empregaram a PCR em amostras de sangue e urina de bovinos sororeagentes na SAM, confirmando a presença de *Leptospira* spp. em 100% das amostras de urina em nenhuma amostra sanguínea. STODDARD et al. (2009) também ressaltaram que a urina é o espécime clínico de eleição para pesquisa de *Leptospira* spp., haja vista que a bactéria permanece na corrente circulatória por cerca de uma semana após início dos sintomas. Tendo em vista o manejo sob o qual os bovinos do presente trabalho eram mantidos, a colheita de urina tornou-se inviável e por tal razão buscou-se avaliar o desempenho da PCR somente no sangue de tais animais.

De maneira semelhante PÉRES (2010) também não obteve bons resultados ao adotar o diagnóstico molecular de leptospirose em veados campeiros sororeagentes na SAM. A PCR não foi capaz de diagnosticar animais positivos para a leptospirose, através do DNA extraído das amostras de sangue total dos cervídeos de vida livre. Sugere-se que o uso do sangue como amostra clínica possa ter sido um dos possíveis motivos para a não detecção dos portadores fora do período de bacteremia. Sabe-se que as leptospiros possuem um curto período circulação no sangue dos ruminantes, por volta de sete a 14

dias, sendo rapidamente destruídas com a posterior opsonificação humoral e fagocitose celular (FAINE et al., 1999).

Para YU & NIELSEN (2010) a sensibilidade e especificidade dos ensaios de PCR não estão bem estabelecidas para amostras clínicas. Nos estudos analisados são encontrados resultados divergentes, indicando a necessidade de pesquisas para validação e padronização dos métodos, antes de empregá-los como teste diagnóstico de rotina para brucelose e leptospirose.

O estágio clínico em que os bovinos encontravam-se no momento da colheita sanguínea não era conhecido. Considerando-se que muitos já apresentavam resposta imune é bastante provável que já tivessem passado pelas fases iniciais da infecção, momento mais adequado para detecção da bactéria no sangue. Além disso, em decorrência do manejo extensivo ou superextensivo em que animais de raças locais são mantidos não é possível colher espécimes clínicos mais apropriados para tais testes. Assim, enquanto não forem padronizados e testados ensaios de PCR em amostras clínicas, estes não devem substituir técnicas sorológicas em estudos epidemiológicos. Contudo, sugere-se que o emprego conjunto de tais métodos possa aumentar as chances de sucesso e a confiabilidade do diagnóstico, após o aprimoramento e a validação da PCR.

## **5 Conclusão**

A concordância dos resultados obtidos pela PCR em amostras sanguíneas e pela sorologia para identificação da infecção por *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. foi fraca, o que reforça a necessidade de validação da PCR tendo em vista que o diagnóstico é mais confiável quando obtido por meio de vários métodos.

## Referências

1. ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 287–296, 2010.
2. AL-AJLAN H.H.; IBRAHIM, A.S.; AL-SALAMAH, A. A. Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, p. 27-33, 2011.
3. ARAÚJO, F. R.; RAMOS, C. A. N.; LUÍZ, H. L.; SCHABIB, I. A. H.; MARÇAL, R. H.; OLIVEIRA, I. I. F. S.; RUSSI, L. S. Avaliação de um Protocolo de Extração de DNA Genômico a Partir de Sangue Total. **Comunicado técnico 120**, Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. p. 1-5, 2009.
4. ASSAD, A. M.; ALQAHTANI, J. M. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia. **Journal of Infection and Public Health**, v. 5, p. 189-194, 2012.
5. BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. London. v.95, p.271-275, 2002.
6. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.
7. BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 435-446, 2002.
8. BROWN, P. D.; GRAVEKAMPS, C.; CARRINGTONY, D. G.; VAN DE KEMPS, H.; HARTSKEERLS, R. A.; EDWARDS, C. N.; EVERARD, C. O. R.; TERPSTRA, W. J.; LEVETT, P. N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 43, p. 110-114, 1995.
9. FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2.ed. Melbourne: MedSci, 1999. 272p.
10. GUMUSSOY, K. S.; OZDEMIR, V. O.; AYDIN, F.; ASLAN, O.; ATABEK, E. ICA, T.; DOGAN, H. O.; DIMAN, Z.; OZTURK,A. Seroprevalence of bovine

- leptospirosis e Kayseri ,Turkey and detection of Leptospire by Polimerase chain reaction. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v.8, n.6, p. 1222-1229, 2009.
11. HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ. P.; DÍAZ C. A.; DALMAU, E. A.; QUINTERO, G. M. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 84, p.1-7, 2011.
  12. HIGGINS, R. Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. **Revue Scientifique et Technique: Office International des Épizooties**, Paris, v. 23, n. 2, p. 569-581, 2004.
  13. ILHAN, Z.; AKSAKAL, A.; EKIN, I. H.; GULHAN, T; SOLMAZ, H.; ERDENLIG, S. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, p. 301–306, 2008.
  14. LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 296-326, apr. 2001.
  15. LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; TURNER, D. E.; STEINGERWALT, A. G.; MAYER, L. W. Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 54, p. 45-49, 2005.
  16. MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 11-17, jan./mar. 2010.
  17. MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, p. 281-285, 1995.
  18. MUKHERJEE, F.; JAIN, J.; PATEL, V.; NAIR, M. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. **Journal of Medical Microbiology**. Edinburgh, v.56, p. 1309-1316, jan./abr. 2007.

19. NAVARRO, E.; ESCRIBANO, J.; FERNÁNDEZ, J. A.; SOLERA, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.34, n. 2, p. 147-151, 2002
20. NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by sorology. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.90, p.447-459, apr. 2002.
21. OIE. Bovine Brucellosis. In: **Terrestrial Manual**. [online]. 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> Acesso em 27 set. 2011.
22. O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, p.70-176, 2006.
23. OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n. 5, p. 398-402, mai. 2010.
24. PÉREZ, I. A. H. F.S. **Ocorrência de *Brucella* sp e *Leptospira interrogans* e variáveis de risco associadas às taxas reprodutivas do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no sudoeste da Nhecolândia, Corumbá-MS**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
25. STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; CAUSTLAND, K. M.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**.v. 64, p. 247–255, 2009.
26. YU, W. L.; NIELSEN, K. Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. **Croatian Medicine Journal**. v.51, p. 306-313, 2010.

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao determinar os aspectos epidemiológicos da infecção por leptospiras em rebanhos de raças localmente adaptadas foi detectada frequência elevada, revelando o comportamento enzoótico da leptospirose em bovinos das raças Curraleiro e Pantaneiro. Os resultados encontrados estão dentro das expectativas para as regiões em que esses bovinos são criados. Porém quando se considera que entre as estratégias de conservação das raças está maior circulação de animais entre os criatórios, essa informação reveste-se de maior importância, pois a disseminação de doenças da esfera reprodutiva pode exercer efeito indesejável nos programas de conservação.

Os fatores associados à infecção por leptospiras estão em parte relacionados ao manejo e em parte são intrínsecos aos animais. Acesso a áreas alagadiças, ocorrência de abortos e prática de abate na propriedade são circunstâncias que favorecem a contaminação de fontes hídricas e pastagens pela bactéria, fazendo que o ciclo de infecção perpetue, somando-se ainda a transmissão pelo contato direto entre bovinos. Nesses casos, sorovares, para os quais o bovino age como hospedeiro de manutenção, como Hardjo e Wolffi, são os de maior relevância.

É importante destacar que a transmissão de doenças entre seres humanos, animais silvestres e domésticos tem influenciado nos conceitos de segurança alimentar, saúde pública e conservação das espécies. A presença de animais silvestres, principalmente quando se considera o manejo extensivo ou superextensivo sob o qual os Pantaneiros e Curraleiros são criados, aparenta ter papel fundamental na epidemiologia da leptospirose nos biomas Cerrado e Pantanal. Elevadas frequências de anticorpos contra sorovares para os quais o bovino é hospedeiro incidental e que tem em indivíduos da fauna local o hospedeiro de manutenção, confirmam tal suspeita e revestem-se de grande importância pelo fato de tais sorovares não estarem presentes em vacinas comerciais.

Inúmeros estudos epidemiológicos sobre leptospirose e outras doenças infecciosas têm sido desenvolvidos com animais silvestres no Pantanal. Ao

buscar trabalhos específicos para o bioma Cerrado detecta-se grande lacuna, constituindo tema importante para futuras pesquisas, sobretudo quando é considerada essa interface entre animais domésticos, silvestres e homem.

A brucelose apresentou baixa frequência em bovinos Curraleiros e revelou estar controlada em bovinos Pantaneiros. É provável que tais índices se devam a medidas como vacinação, que consiste em fator crucial pra o controle da doença.

O emprego de métodos diagnósticos rápidos, seguros, sensíveis e específicos, caracteriza-se em objeto constante de pesquisas. A PCR foi descrita por vários autores na detecção de *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em inúmeros espécimes clínicos, inclusive no sangue. Assim avaliou-se a concordância entre os resultados deste ensaio e de testes sorológicos de referência, na detecção da infecção por *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em um banco de amostras de campo. Tendo em vista as dificuldades para colheita de outros espécimes clínicos nos animais de raças locais, criados sob regime extensivo ou superextensivo empregou-se o sangue dos bovinos, mesmo sem determinação da fase clínica da infecção. Os ensaios revelaram resultados discrepantes aos obtidos pela sorologia, não havendo vantagens em se empregar PCR isoladamente em detrimento de técnicas sorológicas conceituadas, mas sim, como métodos complementares.

A criação de bovinos de raças locais, como Curraleiro e Pantaneiro, tem feito parte da estratégia de conservação das raças e dos biomas nos quais esses animais se inserem. O manejo extensivo, com animais se alimentando de vegetação nativa, adaptados às condições locais em decorrência de sua resistência a patógenos, vem de encontro aos objetivos traçados em acordos internacionais dos quais o Brasil é signatário. As informações geradas nesse trabalho consistem em parte fundamental de outros estudos em desenvolvimento que visam a elaboração um plano sanitário adaptado ao bovino Curraleiro e Pantaneiro, a fim de estabelecer calendário profilático e estratégias de manejo que promovam o controle de doenças e otimizem os índices produtivos dos animais.

# ANEXOS

## ANEXO 1

Questionário aplicado por ocasião das visitas a Núcleos de conservação de bovinos Curraleiros e Pantaneiros.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS / ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA		
CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE BOVINOS DE RAÇAS LOCAIS		
Data: / /	Entrevistador:	
Município:	UF:	
Propriedade:	Proprietário:	
Fone:	Curraleiro: <input type="checkbox"/>	Nºquest:
	Pantaneiro: <input type="checkbox"/>	
1. Caracterização do rebanho de raça local		Qtde (cabeças)
Reprodutor		
Vaca em lactação		
Vaca vazia		
Fêmeas até 1 ano		
Fêmeas de 1 a 2 anos		
Fêmeas de 2 a 3 anos		
Machos até 1 ano		
Machos de 1 a 2 anos		
Machos de 2 a 3 anos		
Rufião		
TOTAL		
2. Cria mais de uma raça?		
( ) sim	( ) não	Qual?
3. Cria outras espécies domésticas na propriedade		
( ) equídeos	( ) felinos	( ) ovinos/caprinos
( ) suínos	( ) caninos	( ) aves
( ) outras:		
4. Há espécies silvestres em vida livre na propriedade		
( ) não tem	( ) cervídeos	( ) roedores
( ) gambá	( ) mão pelada	( ) jaritataca/cangambá
( ) outras:		
5. Adquire Curraleiro / Pantaneiro de outra propriedade?		( ) sim ( ) não
Origem:		
Se adquire, faz quarentena antes de introduzir junto ao rebanho?		( ) sim ( ) não

6. Vende animais para reprodução		<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
7. Aspectos gerais			
Qual a finalidade da criação de curraleiro ou pantaneiro?			
<input type="checkbox"/> consumo	<input type="checkbox"/> leite	<input type="checkbox"/> venda	<input type="checkbox"/> carne
Se tira leite, qual a produção diária?			
Período em meses que as vacas são ordenhadas (lactação):			
Qual o destino das crias?			
<input type="checkbox"/> abate	<input type="checkbox"/> reposição	<input type="checkbox"/> venda	<input type="checkbox"/> outros:
Separa as vacas gestantes?		Possui bezerreiro?	
<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Bezerros ingerem colostro?		<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
8. A criação de curraleiro / panataneiro é sua principal fonte de renda?			
<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não	Esta atividade representa que porcentagem na sua renda mensal?	
9. Qual o tipo de alimentação dada aos animais?			
<input type="checkbox"/> pastagem formada		<input type="checkbox"/> vegetação nativa	<input type="checkbox"/> ração
Tipo:			
<input type="checkbox"/> outros:			
10. Utiliza pastagem em comum com animais de outras propriedades		11. Alugam ou utilizam pasto alugado	
<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
12. Faz suplementação alimentar?			
<input type="checkbox"/> sim		<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> qual?
Se usa sal mineral, possui cocho?		<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
13. Os animais dormem em local determinado (curral)?			
<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> se não, onde dormem?	
14. Existem predadores naturais atacando a criação?			
<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> quais?	
15. Presença de mutucas ou outros insetos hematófagos?			
<input type="checkbox"/> sim		<input type="checkbox"/> não	
16. Presença de áreas alagadiças às quais os animais têm acesso?			
<input type="checkbox"/> sim		<input type="checkbox"/> não	
17. Local de abate de fêmeas e machos adultos no fim da fase reprodutiva:			
<input type="checkbox"/> não abate		<input type="checkbox"/> na própria fazenda	
<input type="checkbox"/> em estabelecimento sem inspeção veterinária		<input type="checkbox"/> em estabelecimento com inspeção veterinária	
18. Utiliza controle reprodutivo?			
<input type="checkbox"/> sim		<input type="checkbox"/> não	
19. Com que frequência renova os reprodutores?			
<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 1 ano	<input type="checkbox"/> mais de 1 ano	

20. Sistema de reprodução utilizado:		
<input type="checkbox"/> monta natural a solta (O touro permanentemente com as fêmeas)		
<input type="checkbox"/> monta controlada (As vacas são levadas ao touro que fica em piquetes)		
Se adota monta natural ou controlada usa touro:	<input type="checkbox"/> emprestado	<input type="checkbox"/> do próprio rebanho
<input type="checkbox"/> inseminação artificial		
21. Quais medidas cirúrgicas são empregadas?		
<input type="checkbox"/> descorna <input type="checkbox"/> castração <input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/> outras:		
22. Possui assistência veterinária?		
<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
23. Ocorrência de aborto nos últimos 12 meses?		
<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> não sabe		
Destino dado ao material de aborto:		
24. Ocorrência de outros problemas reprodutivos		
<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> não sabe		
25. Qual o manejo sanitário utilizado na atividade?		
<input type="checkbox"/> vacinação	<input type="checkbox"/> vermifugação	<input type="checkbox"/> descarrapatização
<input type="checkbox"/> nada <input type="checkbox"/> outros:		
26. Quais as doenças mais frequentes na criação?		
27. Há entrada de pessoas estranhas sem troca de roupas/sapatos?		
<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> não sabe		
28. Prevenção sanitária, marcar as que faz:		
Enfermidades	sim	não
Febre aftosa		
Leptospirose		
Manqueira		
Brucelose		
Paratifo		
Raiva		
Enterotoxemia		
Botulismo		
Vermifugação		
Outros:		
29. Quais as vantagens da criação do gado Curraleiro/Pantaneiro em relação as demais raças?		
<input type="checkbox"/> rusticidade <input type="checkbox"/> baixo custo <input type="checkbox"/> aptidão mista		
<input type="checkbox"/> outros:		
30. Quais as desvantagens da criação do gado Curraleiro/Pantaneiro em relação as demais raças?		
<input type="checkbox"/> baixa valorização <input type="checkbox"/> baixa produtividade		
<input type="checkbox"/> desenvolvimento lento <input type="checkbox"/> dificuldade de comercialização		
<input type="checkbox"/> outros:		

## ANEXO 2

Variáveis avaliadas para leptospirose em rebanhos de bovinos Curraleiros, considerando as reações para pelo menos um sorovar.

Variáveis	Descrição	Expostos/focos		Expostos/ não foco		p
		n	%	n	%	
Idade	Até 12 meses	47	28,66	117	71,34	
	Entre 12 e 24	10	33,33	20	66,67	
	Acima de 24	516	47,51	570	52,49	<0,001
Tamanho do rebanho	Até 50 animais	57	51,82	53	48,18	0,038
	Entre 51 e 100 animais	119	39,14	185	60,86	
	Mais de 100 animais	397	45,84	469	54,16	
Ingresso de animais	Compra animais	467	46,70	533	53,30	0,009
	Não compra animais	106	37,86	174	62,14	
Quarentena	Adota	234	51,66	219	48,34	<0,001
	Não adota	233	42,60	314	57,40	
	Não se aplica	106	37,86	174	62,14	
Cria outra raça	Sim	415	46,84	471	53,16	0,028
	Não	158	40,10	236	59,90	
Acesso a áreas alagadiças	Sim	300	52,82	268	47,18	<0,001
	Não	273	38,34	439	61,66	<0,001
Ocorrência de abortos na propriedade	Sim	242	54,14	205	45,86	<0,001
	Não	322	41,55	453	58,45	
Vacina contra leptospirose	Sim	68	85,00	12	15,00	<0,001
	Não	505	42,08	695	57,92	
Manejo superextensivo	Sim	117	44,66	145	55,34	
	Não	456	44,79	562	55,21	1
Sexo	Fêmea	455	45,09	554	54,91	0,67
	Macho	118	43,54	153	56,46	
Pastagem em comum	Sim	57	51,82	53	48,18	0,132
	Não	516	44,10	654	55,90	
Aluga pasto	Sim	5	27,78	13	72,22	
	Não	568	45,01	694	54,99	0,160
Abate fazenda	Sim	280	50,63	273	49,37	<0,001
	Não	293	40,30	434	59,70	

## ANEXO 3

Variáveis avaliadas para leptospirose em rebanhos de bovinos Pantaneiros, considerando as reações para pelo menos um sorovar.

Variáveis	Descrição	Pos		Neg		p
		n	%	n	%	
Idade	Até 12 meses	11	16,92	54	83,08	<0,001
	Entre 12 e 24	23	65,71	12	34,29	
	Acima de 24	93	62,84	55	37,16	
Tamanho do rebanho	Até 50 animais	31	58,49	22	41,51	0,278
	Mais de 100 animais	96	49,23	99	50,77	
Ingresso de animais	Compra animais	113	48,50	120	51,50	<0,001
	Não compra animais	14	93,33	1	6,67	
Quarentena	Não adota	113	48,50	120	51,50	<0,001
	Não se aplica	14	93,33	1	6,67	
Monta natural	Sim	113	48,50	120	51,50	<0,001
	Não	14	93,33	1	6,67	
Ocorrência de abortos na propriedade	Sim	96	49,23	99	50,77	0,278
	Não	31	58,50	22	41,50	
Touro	Não possui	14	93,33	1	6,67	<0,001
	Próprio	113	48,50	120	51,50	
Manejo superextensivo	Sim	113	48,50	120	51,50	<0,001
	Não	14	93,33	1	6,67	
Sexo	Fêmea	108	56,84	82	43,16	0,001
	Macho	19	32,76	39	67,24	
Aluga pasto	Sim	52	53,06	46	46,94	0,697
	Não	75	50,00	75	50,00	