

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

IGOR ALEXANDRE HANY FUZETA SCHABIB PÉRES

**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**

**OCCURRENCE OF *Brucella* sp. AND *Leptospira interrogans* AND RISK
VARIABLES ASSOCIATED TO THE PAMPAS DEER'S (*Ozotoceros bezoarticus*)
REPRODUCTIVE TAXES IN THE SOUTHWEST OF NHECOLÂNDIA,
CORUMBÁ-MS**

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
OUTUBRO DE 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

IGOR ALEXANDRE HANY FUZETA SCHABIB PÉRES

**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**

**OCCURRENCE OF *Brucella* sp. AND *Leptospira interrogans* AND RISK
VARIABLES ASSOCIATED TO THE PAMPAS DEER'S (*Ozotoceros bezoarticus*)
REPRODUCTIVE TAXES IN THE SOUTHWEST OF NHECOLÂNDIA,
CORUMBÁ-MS**

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
OUTUBRO DE 2010**

IGOR ALEXANDRE HANY FUZETA SCHABIB PÉRES

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

Orientadora: Prfof^a Dr^a Aiesca Oliveira Pellegrin

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Grácia Maria Soares Rosinha

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área Concentração: Saúde Animal.

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL**

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

XXX.X.....Schabib Péres, Igor Alexandre Hany Fuzeta
 SXXXx.....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/ Igor Alexandre Hany Fuzeta Schabib Péres Campo Grande, MS, Campus de Campo Grande. 2010.
 XXx.
 Dissertação de Mestrado
 1. *Ozotoceros bezoarticus* – *Brucella* sp. – *Leptospira interrogans*
 2. Doenças infecciosas – Diagnóstico – Epidemiologia. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo setor de biblioteca Central da UFMS.

LOMBADA
 DISSERTAÇÃO MESTRADO NOME DO AUTORUFMS ANO.

Igor Alexandre Hany Fuzeta Schabib Péres

"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"

"OCCURRENCE OF *Brucella* sp. AND *Leptospira interrogans* AND RISK VARIABLES ASSOCIATED TO THE PAMPAS DEER'S (*Ozotoceros bezoarticus*) REPRODUCTIVE TAXES IN THE SOUTHWEST OF NHECOLÂNDIA, CORUMBÁ-MS"

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

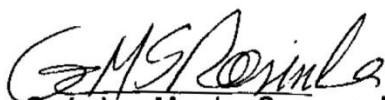
Área concentração: Saúde Animal

APROVADA: 22/10/2010



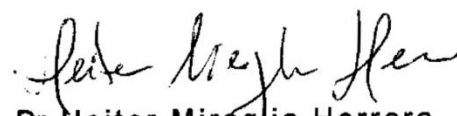
Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin

Orientadora



Dra. Grácia Maria Soares Rosinha

Co-orientadora



Dr. Heitor Miraglia Herrera

À minha Nanda, sem limites e sem fim

Aos meus pais: Wadad e Nery

Aos meus irmãos: Luana, Nader e Pedro

À querida avó Wadia Al Camy de Schabib

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Waded Schabib Hany e Ney Fuzeta Péres e irmãos, Luana, Neder e Pedro pelo amor, paciência, apoio e incentivo, me impulsionando desde o início.

A minha amada Fernanda Lopez Athas pelo amor, companheirismo e pela participação direta, aperfeiçoando etapas cruciais desta pesquisa, sendo a minha maior incentivadora.

Aos meus tios, tias, avós, primos, sogros e cunhado pelo apoio e por tornarem esta minha empreitada mais agradável e proveitosa.

A minha orientadora Dr^a Aiesca Oliveira Pellegrin, sobretudo pela amizade, incentivo, oportunidade, por seu caráter inovador, confiança e sabedoria para ouvir e instruir.

A Dr^a Grácia Maria Soares Rosinha pela co-orientação e Dr^a Carina Elisei de Oliveira pela supervisão nas análises realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte.

A Prof^a Dr^a. Ana Luiza Alves Rosa Osório pela supervisão na normatização do trabalho e nas análises dos dados.

Ao pesquisador Msc. Walfrido Moraes Tomás pelas sugestões, oportunidades, apoio, amizade e pelas instruções referentes à fauna no Pantanal.

Ao Dr^o. Andrey Pereira Lage e a sua equipe do Laboratório de Bacteriologia Aplicada/UFMG pela oportunidade de estágio e processamento do material.

A médica veterinária Adriana Conceição Guercio e ao Dr^o Silvio Arruda Vasconcellos pelo apoio no diagnóstico da leptospirose no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva/USP.

Ao médico veterinário Msc. Paulo André Lima Borges, pela amizade, empenho e treinamento na captura do veado-campeiro e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos amigos de longa data Msc. Roosevelt Isaías Carvalho Souza e Namor Pinheiro Zimmermann pelo companheirismo e apoio na logística deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal/UFMS, através do coordenador Dr^o Gumercindo Loriano Franco e secretária Marilete Otaño Peixoto Ferencz.

A CAPES pela bolsa, ao CNPq por financiar o projeto e ao IBAMA pelas autorizações de captura e coleta de material biológico dos animais silvestres.

Aos docentes do programa de pós-graduação, pelas contribuições no projeto de pesquisa e pelo aperfeiçoamento dos alunos na preparação e exposição de projetos de pesquisa.

A UFMS, Embrapa Pantanal, Fazenda Nhumirim, Embrapa Gado de Corte, UFMG e USP, através dos funcionários, colegas e estagiários que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento da pesquisa que gerou esta dissertação.

ABSTRACT

The *Brucella* sp. and the *Leptospira interrogans* are among the main etiological agents that infect domestic species, wild animals and the man. In the Pantanal, the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) shares your areas and resources with the bovines created extensively, being exposed and being susceptible to many catle diseases. The present study was developed at the Southwest of the region of the Nhecolândia, located in the municipal district of Corumbá/MS. We had as objectives to accomplish an epidemic inquiry on the frequency of the brucelosis and of the leptospirosis in the population of pampas deer sampled, through serologic and molecular diagnosis. We also aimed to evaluate the risk variables related with the diseases and associated to the occurrence of pampas deer's females without nestlings in the births station. 56 females and three males of the pampas deer were captured and identified for the collection of total blood and serum for molecular and serology diagnosis of the infection. In all the females ultrasound scan was accomplished, tends as result a tax of gestation of 98,2% (55/56). The proportion of serum-reactors for *Leptospira* sp. by microagglutination test (MAT) was 28,8% (17/59) and the serovars pomona and autumnalis were diagnosed in 64,7% (11/17) and 29,4% (5/17) of the positive animals, respectively. In the polymerase chain reaction (PCR) for *Leptospira* sp. with the primers *G1/G2* and *lep1/lep2*, the DNA of *Leptospira* sp. was not detected in the blood of any cervid. For *Brucella* sp. we found 10,2% (6/59) of assertiveness taxes by buffered antigen plate agglutination test (BPAT), 3,4% (2/59) by 2 mercaptoethanol test (2ME) and 11,7% (7/59) by PCR using the primers *IS711 AF* and *IS711 CR*. There was significant association among positive results for brucelosis by BPAT and PCR *IS711* (*odds ratio* = 12,2500). The occurrence of the leptospirosis was significantly associated at animals with medium rectal temperatures above 38,76 °C and at cervids groups formed by three or more individuals. As much the brucelosis as the leptospirosis wasn't significantly associated to the females of pampas deer found without their nestlings in the birth station, situation that was related with the reproductive age of these primipare females (*odds ratio* = 12,3077).

TERMS OF INDEXATION: *Ozotoceros bezoarticus*, occurrence, leptospirosis, brucelosis, reproductive impact, risk variables,

RESUMO

A *Brucella* sp. e a *Leptospira interrogans* estão entre os principais agentes etiológicos que acometem espécies domésticas, selvagens e o homem. No Pantanal, o veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) compartilha áreas e recursos com bovinos criados extensivamente, estando exposto e sendo susceptível a muitas das doenças do gado. O presente estudo foi desenvolvido no sudoeste da sub-região pantaneira da Nhecolândia, localizada no município de Corumbá/MS. Tivemos como objetivo a realização de um inquérito epidemiológico sobre a frequência da brucelose e da leptospirose na população de veados-campeiros estudada, por meio de técnicas diagnósticas sorológicas e moleculares. Também objetivamos avaliar as variáveis de risco relacionadas com as doenças e associadas à ocorrência de fêmeas de veado-campeiro sem filhotes na estação de nascimentos. Foram capturadas e identificadas 56 fêmeas e três machos de veado-campeiro para a coleta de sangue total e soro para diagnóstico molecular e sorologia das doenças. Em todas as fêmeas foi realizada ultra-sonografia, tendo como resultado uma taxa de gestação de 98,21% (55/56). A proporção de soro-reatores pela Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi de 28,81% (17/59) e os sorovares pomona e autumnalis foram diagnosticados em 64,71% (11/17) e 29,41% (5/17) dos animais positivos, respectivamente. Utilizando-se os *primers* *G1/G2* e *lep1/lep2* não foi detectado DNA de *Leptospira* sp. no sangue de nenhum cervídeo. Para a *Brucella* sp. foram encontradas taxas de positividade de 10,17% (6/59) pela prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), 3,39% (2/59) pelo teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) e de 11,86% (7/59) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* *IS711 AF* e *IS711 CR*. Houve associação significativa entre os resultados positivos para brucelose pelo AAT e pela PCR *IS711* (*odds ratio* = 12,2500). A ocorrência da leptospirose esteve significativamente associada aos animais com temperaturas retais médias acima de 38,76 °C e aos grupos de cervídeos formados por três ou mais indivíduos. Tanto a brucelose como a leptospirose não estiveram significativamente associadas às fêmeas de veado-campeiro encontradas sem os seus filhotes na estação de nascimento, situação que esteve relacionada com a idade reprodutiva destas fêmeas que eram primíparas (*odds ratio* = 12,3077).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Ozotoceros bezoarticus*, ocorrência, leptospirose, brucelose, impacto reprodutivo, variáveis de risco.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Veado-campeiro (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>)	14
2.2	Brucelose	15
2.2.1	Microbiologia	15
2.2.2	Epidemiologia	16
2.2.3	Fisiopatogenia e resposta imune.....	23
2.2.4	Sintomatologia e alterações anatomo-histopatológicas.....	25
2.2.5	Diagnóstico.....	26
2.2.6	Tratamento	31
2.2.7	Vacinação	31
2.3	Leptospirose	32
2.3.1	Importância.....	32
2.3.2	Microbiologia	33
2.3.3	Epidemiologia	35
2.3.4	Fisiopatogenia e resposta imune.....	37
2.3.5	Sintomatologia e alterações anatomo-histopatológicas.....	39
2.3.6	Diagnóstico.....	40
2.3.7	Tratamento	43
2.3.8	Controle e vacinação	43
3	REFERÊNCIAS	44
ARTIGO 1.		
OCORRÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DA BRUCELOSE COM AS TAXAS DE FÊMEAS DE VEADO-CAMPEIRO (<i>OZOTOCEROS BEZOARTICUS</i>) ENCONTRADAS SEM FILHOTES NA NHECOLÂNDIA, CORUMBÁ, MS		56
ARTIGO 2.		
VARIÁVEIS DE RISCO ASSOCIADAS À OCORRÊNCIA DA LEPTOSPIROSE E ÀS TAXAS REPRODUTIVAS EM VEADO-CAMPEIRO (<i>OZOTOCEROS BEZOARTICUS</i>) NA REGIÃO DA NHECOLÂNDIA, CORUMBÁ, MS, BRASIL		72

1 INTRODUÇÃO

A vigilância e o monitoramento das doenças que atingem vários grupos taxonômicos, especialmente nas áreas em que a produção animal está integrada à natureza, são ferramentas essenciais para o delineamento dos programas sanitários aplicáveis ao ser humano (zoonoses e saúde pública), aos animais domésticos (sanidade e produção animal) e aos animais selvagens (conservação) (WOBESER, 2006).

A brucelose e a leptospirose são duas doenças amplamente distribuídas e de ocorrência natural ou acidental no homem, animais domésticos e selvagens (BENGIS, 2002a; GODFROID, 2002; MACKINTOSH et al. 2002).

A eleição da espécie selvagem a ser investigada deve preconizar os hospedeiros intimamente relacionados com o ambiente, que sejam susceptíveis aos patógenos locais e que possam ser influenciados por fatores que modificam a dinâmica epidemiológica natural das doenças (WOBESER, 2002; 2006; MANGINI e SILVA, 2007).

Neste estudo, foi eleito como modelo o veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) por ser um ruminante selvagem que partilha das características biológicas, do ambiente e das doenças dos bovinos no Pantanal (RODRIGUES et al., 2002; LACERDA, 2008), havendo uma estreita correspondência epidemiológica entre estas espécies.

Os ungulados selvagens têm sido incriminados por atuar como fonte de doenças infecciosas para animais domésticos. No Parque Nacional do Yellowstone, o bisão (*Bison bison*) e o veado-vermelho (*Cervus elaphus canadensis*) foram relacionados à cadeia epidemiológica da brucelose bovina (AGUIRRE & STARKEY, 1994). Os países que eliminaram a brucelose de seus rebanhos domésticos, e os que se encontram em estágios avançados no controle desta doença, monitoraram constantemente os animais selvagens susceptíveis, sob o risco de a fauna atuar como fonte disseminadora. Por outro lado, nas regiões onde a prevalência da brucelose no gado é alta o risco é a infecção dos animais selvagens (GODFROID, 2002).

Os animais domésticos são tidos como introdutores e transmissores de patógenos exóticos às espécies selvagens. Frequentemente são reportados casos nos quais as leptospiroses sorovares hardjo e pomona foram encontradas em cervídeos, tendo estas o bovino como reservatório natural para a sorovar hardjo, ou hospedeiro acidental e disseminador da sorovar pomona (FOURNIER et al., 1986; FAINE, 1999; MATHIAS et al., 1999).

Nos ambientes onde ocorrem altas taxas de contato entre a fauna e os animais de produção, o monitoramento epidemiológico deve ser direcionado para as doenças que podem sofrer o processo de “transbordamento interespecífico” (*spill over*), afetando hospedeiros acidentais (DASZAK et al., 2000; BENGIS, 2002b).

No Pantanal, o gado divide as suas áreas de vida com os animais selvagens nativos (“simpatria”), devido ao característico sistema de produção extensivo (SANTOS et al., 2002). As características morfoclimáticas deste ambiente podem elevar as concentrações de animais/área em determinadas épocas do ano (cheias), o que pode favorecer o contato interespecífico, importante aspecto na dinâmica das doenças infecciosas que realizam *spill over* (WOBESER, 2006). As sorovares causadoras da leptospirose e as espécies e biotipos que causam a brucelose realizam o *spill over* multidirecionalmente (GODFROID, 2002; MACKINTOSH et al., 2002).

Neste contexto são necessárias ferramentas de diagnóstico com alto grau de acurácia, já que muitas vezes não haverá uma segunda oportunidade de coletar as amostras dos animais selvagens, por dificuldades metodológicas.

As técnicas de diagnóstico sorológico são, geralmente, mais rápidas e baratas quando comparadas aos métodos diretos (NIELSEN, 2002), porém os resultados obtidos se referem aos anticorpos encontrados no hospedeiro, podendo não haver a presença do agente infeccioso circulante no organismo.

Nos animais selvagens estes métodos são amplamente empregados, porém de forma presuntiva, já que a interpretação dos resultados é controversa (como ocorre muitas vezes nos animais domésticos). O diagnóstico pode ser afetado pelo estágio em que se encontra a infecção, por reações cruzadas com outros patógenos, pela capacidade de resposta do hospedeiro ou pelas características antigênicas do agente infectante (WOBESER, 2006).

A PCR (reação da polimerase em cadeia) despontou como uma alternativa à lentidão e periculosidade do isolamento microbiológico e como uma prova mais segura frente às reações cruzadas que ocorrem na sorologia (BRICKER, 2002a). Além destas características, ela detecta o DNA de um patógeno na maioria dos fluidos e tecidos do organismo do hospedeiro, podendo ser direcionada para os locais mais colonizados pelo agente infeccioso (HEINEMANN et al., 2000; RICHTZENHAIN et al., 2002; MIYASHIRO et al, 2007). As principais desvantagens da PCR são os elevados custos de aplicação da técnica e a padronização altamente específica, que se não for seguida rigorosamente compromete a eficiência do diagnóstico (BRICKER et al., 2003).

O processo de validação de um dado teste de diagnóstico padroniza a técnica empregada para uma determinada espécie ou situação, estando relacionado com a sensibilidade e a especificidade na detecção dos verdadeiros estados positivos e negativos para uma infecção (GREINER e GAEDNER, 2000). Como a validação é espécie-específica, cada potencial hospedeiro, necessita de seus parâmetros próprios e homogêneos, estabelecidos descritiva ou estatisticamente (GREINER et al. 2000; GALL et al., 2001).

Assim como os anticorpos na sorologia não podem ser interpretados isoladamente, a simples presença do DNA de um patógeno no animal não é indicativa de doença, devendo ser considerados os aspectos clínico-epidemiológicos para analisar a real importância do resultado obtido (SMITH e SLENINNG, 2000). Mesmo os resultados positivos e validados para uma dada doença, devem ser corroborados com a real participação epidemiológica de um animal selvagem (WOBESER, 2006), que pode ser de três naturezas distintas:

- Hospedeiro-reservatório natural: é mantenedor da doença no ambiente;
- Hospedeiro-infectado ou terminal (*“Dead-end host”*): que apesar de albergar um patógeno não perpetua a doença;
- Hospedeiro-infeccioso (*“Spillover host”*): que apesar de não ser o reservatório natural do patógeno, é susceptível à infecção, podendo inclusive “devolver” o agente ao hospedeiro de origem (*“Spill back”*).

Este projeto de dissertação tem aderência ao projeto "Avaliação dos riscos potenciais da presença de reservatórios selvagens de Brucelose e Leptospirose no Pantanal na implantação de estratégias de controle e erradicação destas doenças", aprovado e recém contratado no âmbito do Edital CNPq/MAPA/SDA Nº 64/2008.

Com o avanço do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), do MAPA, espera-se que os esforços migrem no sentido da erradicação, fazendo-se necessários os dados referentes à participação epidemiológica das espécies selvagens, principalmente das que convivem com bovinos, devendo estas ser incorporadas nas estratégias de combate para a total erradicação da doença.

Seguindo a tendência de países em estágio avançado de controle e erradicação de doenças dos animais, Mato Grosso do Sul poderá ser pioneiro no Brasil na efetivação de um programa de vigilância epidemiológica em reservatórios selvagens, sendo modelo

nacional. Os produtos agropecuários gerados no estado seriam visados pela comunidade comercial internacional, tanto pela qualidade sanitária como pela produção sustentável em harmonia com a natureza conservada.

Os objetivos deste estudo foram realizar um inquérito epidemiológico sobre a frequência da brucelose e da leptospirose em veados-campeiros no sudoeste da sub-região pantaneira da Nhecolândia (Corumbá, MS, Brasil) por meio de técnicas diagnósticas sorológicas e moleculares, além de avaliar as variáveis de risco relacionadas com as doenças e associadas à ocorrência de fêmeas de veado-campeiro sem filhotes na estação de nascimentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*)

O veado-campeiro é um artiodáctilo ruminante que faz parte da família dos oito cervídeos brasileiros, sendo considerado de porte médio, com peso aproximado nos adultos de 30kg e altura de cernelha de 65cm (DUARTE, 2007).

A população do veado-campeiro diminuiu ao longo do século passado e esta situação continua se agravando, devido à alteração e fragmentação dos *habitats* naturais, à caça ilegal e ao convívio com animais domésticos e exóticos que podem tanto competir por recursos com os cervídeos como transmitir doenças a estes.

Formaram-se grupos de populações com pouca diversidade genética, o que promove a endogamia e a depressão gênica. As doenças de animais domésticos e dos animais exóticos ferais podem encontrar organismos selvagens susceptíveis e pouco resistentes, agravando os riscos da extinção (MERINO et al., 1997). Godfroid (2002) descreveu em sua revisão da brucelose no meio selvagem que as ações do ser humano podem modificar a ecologia das infecções para esta doença.

Os cervídeos compartilham de muitas das características biológicas dos bovinos, tendo preferência pelos mesmos *habitats* (campo aberto e cerrado), possuindo hábitos alimentares similares e sendo acometido por doenças em comum (DUARTE & MERINO, 1997; TIEPOLO & TOMAS, 2006; DUARTE, 2007). Por esta estreita

ligação existente entre estas duas espécies, o veado-campeiro tem potencial para atuar como uma “sentinela” epidemiológica para os bovinos, sendo a recíproca verdadeira.

Dentre os agentes que podem acometer os cervídeos já foram reportados o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia bovina, vírus sincicial respiratório, vírus da parainfluenza tipo 3, vírus da língua azul, vírus da doença da hemorragia epizootica tipo 1 e 2 (BENGIS et al., 2002), *Leptospira interrogans* (LILENBAUM et al.; MACKINTOSH et al., 2002; GIRIO et al., 2004; CORRÊA, 2007), *Brucella abortus* e *B. suis* tipo 4 (AGUIRRE et al., 1995; BENGIS et al., GODFROID; MACKINTOSH et al., 2002), *Anaplasma marginale*, *Borrelia burgdorferi* (AGUIRRE et al., 1995), *Babesia* sp. (DUARTE, 2007; VILLAS-BOAS et al., 2007), *Mycobacterium bovis* (BENGIS et al., 2002; CATÃO-DIAS & CARVALHO, 2007).

2.2 Brucelose

2.2.1 Microbiologia

As bactérias do gênero *Brucella* sp. são cocobacilos intracelulares facultativos, aeróbios, microaerófilos, pleomórficos, Gram negativos, com dimensões de 0,6 a 1,5 µm por 0,5 a 0,7 µm. Não são capsuladas, não possuem estruturas de locomoção e nem esporulam. Embora a maioria das espécies de *Brucella* sp. possuam 2 cromossomos circulares, *B. suis* biovar 3 tem apenas um cromossomo. Os nucleotídeos G ou C constituem 57 mol % do DNA de *Brucella* sp. (BOSCHIROLI et al, 2001; WALKER, 2003; QUINN et al., 2005; BRASIL, 2006).

Segundo estudos de hibridização de DNA todas as espécies de *Brucella* sp. eram pertencentes a única genoespécie *Brucella mellitensis* (VERGER et al. 1985), porém a partir do isolamento e caracterização de *Brucella* sp. em mamíferos marinhos (EWALT et al., 1994) e dos avanços tecnológicos na biologia molecular e genética bacteriana a monoespecificidade do gênero foi contestada (MORENO et al., 2002).

Atualmente discute-se a divisão taxonômica em 10 espécies: *B. abortus* (biotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9), *B. mellitensis* (biotipos 1, 2, 3), *B. suis* (biotipos 1, 2, 3, 4, 5), *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti* e *B. inopinata* (WHATMORE, 2009; MAYER-SCHOOL et al., 2010). A correta classificação taxonômica permite a compreensão da coevolução e coadaptação de cada espécie de

patógeno ao seu hospedeiro natural e ao ecossistema à que este está integrado. Sendo assim, aspectos genéticos, ecológicos, patogênicos, fisiológicos e morfoclimáticos, importantes para a *Brucella* sp. podem ser eluciados, embasando as medidas que orientam o controle sanitário deste agente.

Brucella sp. pode sobreviver por até 4 meses na água ou solo úmido em condições de temperatura e umidade favoráveis, ou por até 8 meses no interior de material biológico como leite, placenta, feto abortado, urina e fezes (WALKER, 2003; BRASIL, 2006). Os métodos de pasteurização e o uso de desinfetantes a base de cloro, formaldeído ou o álcool 70° são eficientes para eliminar a bactéria quando utilizados nas concentrações recomendadas (OMS, 1986; PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

As colônias de *Brucella* sp. podem ser visualizadas a partir do 3º dia pós-inoculação, porém somente por volta 12º dia é possível avaliar o aspecto macroscópico destas, que podem ser lisas devido a presença da cadeia lateral “O” no lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, ou rugosas (sem a cadeia lateral no LPS). As colônias lisas, características de *B. abortus*, *B. mellitensis*, *B. suis* e *B. neotomae* são esbranquiçadas, convexas e de consistência cremosa. Já as colônias rugosas podem ser dos tipos estrita (característica de *B. ovis*): seca, amarelo-opaca e friável, ou mucóide (aspecto de *B. canis*): semelhante à estrita, porém com textura viscosa. As colônias lisas, após sucessivas replicações laboratoriais ou com o passar do tempo no meio de isolamento podem se tornar rugosas. (WALKER, 2003; QUINN et al., 2005; OSÓRIO e MONTEIRO, 2006).

Estas variações morfológicas surgiram da adaptação natural de *Brucella* sp. aos seus hospedeiros, estando associadas na *B. abortus*, *B. mellitensis* e *B. suis* com a virulência e a patogenicidade (GOMES, 2009).

2.2.2 Epidemiologia

2.2.2.1 Distribuição e ocorrência

A brucelose ocorre em humanos e em animais domésticos e selvagens em todo o mundo, estando associada à presença da *Brucella* sp. no ambiente e em seus hospedeiros reservatórios (GODFROID, 2002).

Nos países onde os programas de controle da brucelose foram implantados eficientemente no início do século passado foram alcançados ótimos resultados e até mesmo a erradicação nos rebanhos domésticos (GODFROID e KÄSBOHRER, 2002; RAGAN, 2002). Tanto as nações livres da brucelose como as que apresentam baixas taxas de prevalência nos bovinos tendem a direcionar suas ações de monitoramento nas populações de animais selvagens (USDA, 2003).

A *B. suis* biovar 2 foi isolada de porcos selvagens na Dinamarca (país livre de brucelose em bovinos) e na França, havendo uma preocupação com a reintrodução da doença nos rebanhos domésticos, apesar da *B. suis* biovar 2 não causar zoonose (GODFROID e KÄSBÖHRER, 2002). Nos EUA e Canadá, com o sucesso dos programas de controle sanitário, a brucelose ficou restrita apenas às áreas circundantes dos grandes Parques Nacionais. Nestes ambientes os animais selvagens como bisões, cervídeos e suídeos tem sido afetados por *B. abortus*, eliminando a bactéria no ambiente (AGUIRRE, 1995; CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998; USDA, 2003).

O Brasil vem atualizando os dados do último levantamento nacional de prevalência da brucelose realizado em 1975 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (POESTER et al., 2009; LAGE, 2008). Quanto às espécies e biovariedades (ou biovars) de *Brucella* sp. existentes no Brasil, já foram identificadas *B. abortus* biovars 1, 2, 3, 4 e 6 (POESTER 2002; MINHARRO et al., 2008), *B. suis* biovar 1, *B. ovis* e *B. canis* (BRASIL, 2006). *B. mellitensis*, principal a gente da brucelose em cabras e a espécie mais patogênica para o homem, não foi isolada no Brasil (BRASIL, 2006), apesar de estar presente em países fronteiriços como a Argentina, Paraguai e Peru (LUCERO, 2008).

No Mato Grosso do Sul os dados mais recentes, referentes a 2009, indicaram 4,5% de soroprevalência para brucelose no gado de corte do planalto e 12,6% de prevalência para bovinos na região pantaneira por meio do teste sorológico do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) (Chate et al., 2009).

Dentre os animais selvagens, a *Brucella* sp. foi descrita principalmente em bovídeos e cervídeos: bisões (*Bison bison*) no América do Norte (TESSARO, et al. 1990; BEVINS et al., 1996, CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998), iaques na Mongólia (*Bos grunniens*), diversas espécies de bovídeos e cervídeos africanos (OMS, 1986, GODFROID, 2002), renas e caribus (*Rangifer tarandus*) na Rússia, Canadá e EUA (OMS, 1986; FORBES, 1991; GALL et al., 2001), alces (*Alces alces*) (DIETERICH et

al., 1991), cervos (*Cervus elaphus*) (AGUIRRE et al., 1995; GALL et al., 2001) e veados vermelhos na Nova Zelândia (RIDLER, 2001)

Outras espécies de vida livre como porcos selvagens (*Sus scroffa*) no Japão, Europa e EUA (EBANI et al., 2003; DAHOUK et al., 2005; WATARAI et al., 2006; CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998), lobos (*Canis lupus*) e coiotes (*Canis latrans*) da América do Norte (CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998; DAVIS e ELZER, 2002) foram relatados como potenciais reservatórios ou disseminadores da brucelose no ambiente.

Quatro *Brucella* sp. são de ocorrência natural em espécies selvagens, são elas *B. neotomae* identificada no rato-do-deserto-americano (*Neotoma lepida*) (STOENNER e LACKMAN, 1957), *B. pinnipedialis* e *B. cataceae* isoladas de diversos mamíferos marinhos (EWALT et al., 1994; FOSTER et al., 2002) e *B. microti* recentemente descrita no rato-selvagem-europeu (*Microtus arvalis*) e na raposa-vermelha-européia (*Vulpes vulpes*) (SCHOLZ et al., 2008; SCHOLZ et al., 2009).

No Brasil, em um levantamento realizado no Pantanal sul-mato-grossense, capivaras (*Hydrochoerus hydrochaerys*) e queixadas (*Tayassu pecari*) foram soropositivos para *Brucella* sp. (ITO et al., 1998). Mathias et al., em 1999 não encontrou anticorpos reagentes para *B. abortus* em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), porém na mesma região do Pantanal, *Brucella* sp. foi diagnosticada a partir de amostras de sangue desta mesma espécie pela Reação da Cadeia de Polimerase (PCR), apresentando 20,4% de positividade (ELISEI et al., 2010).

Segundo POESTER et al. 2009, para iniciar um programa de controle de brucelose bovina, deve-se conhecer a situação epidemiológica da doença por duas razões principais: embasar a escolha das melhores estratégias tendo em vista a frequência e distribuição da doença nas populações estudadas; e possibilitar o acompanhamento do programa atentando-se para possíveis correções, a fim de evitar desperdício de tempo e de recursos. Neste contexto, é de importância fundamental a inclusão das populações selvagens que podem ser acometidas pela brucelose nos estudos de prevalência que sustentam o programa de controle nacional. Isto é ainda mais relevante nas áreas onde a pecuária é desenvolvida em estreito contato com o ambiente e a fauna nativa.

2.2.2.2 Hospedeiros e reservatórios

As diferentes espécies e biovariedades do gênero *Brucella* sp. adaptaram-se a um ou mais hospedeiros habituais, porém a maioria destas bactérias podem ser infectantes também para outras espécies para as quais não são consideradas de ocorrência natural (WALKER, 2003). Na Tabela 1. são demonstrados as espécies de *Brucella* sp. conhecidas até o momento, as suas biovars e os grupos de animais que constituem os seus hospedeiros habituais e ocasionais.

Tabela 1. Espécies e biovars de *Brucella* sp. e seus hospedeiros habituais e ocasionais

Espécies	Biovars	Hospedeiros Habituais	Hospedeiros Ocasionais
<i>Brucella abortus</i>	1 a 7 e 9	Bovinos	Homem, cervídeos, bovídeos, bubalinos, bisões, suínos, queixadas, ovinos e caprinos selvagens, equídeos, hipopótamos, canídeos, lebres, capivara, camelo
<i>B. mellitensis</i>	1 a 3	Caprinos e ovinos	Homem, caprinos selvagens, camelídeos
<i>B. suis</i>	1 a 5	Suínos e renas	Homem, cervídeos, carnívoros
<i>B. ovis</i>		Ovinos	Cervídeos
<i>B. canis</i>		Caninos	Homem e felinos
<i>B. neotomae</i>		Rato-do-deserto	-
<i>B. pinnipediade</i>		Focas e lontras	-
<i>B. cetaceae</i>		Baleias e golfinhos	Homem (acidentalmente)
<i>B. microti</i>		Rato-selvagem	Raposa-vermelha
<i>B. inopinata</i>		Desconhecido	Homem

Os bovinos são os hospedeiros preferenciais para *B. abortus*, entretanto esta pode ocorrer também em bubalinos, ovinos, caprinos, suínos, cães e equídeos. Com exceção dos bubalinos, a maioria destes hospedeiros domésticos acidentais são

apontados como terminais na cadeia de transmissão da brucelose, embora alguns deles já tenham sido descritos como fontes de infecção para os bovinos (PAULIN, 2003).

Diversos levantamentos foram conduzidos para identificar a brucelose e a sua frequência em várias espécies de animais selvagens do Brasil e no mundo (OMS, 1986, AGUIRRE, 1995; CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998; ITO et al., 1998). Quando se estuda um hospedeiro selvagem como reservatório ou fonte de infecção para uma dada doença, é necessário diferenciar se o agente etiológico circula naturalmente na espécie selvagem ou se ele foi introduzido pela exposição e contato com os animais domésticos, fenômeno denominado “*spill over*”. Se a situação encontrada for o segundo caso, o monitoramento das populações selvagens torna-se prioritário, sob o risco de re-introdução (“*spillback*”) da doença nos rebanhos domésticos (GODFROID, 2002).

A susceptibilidade dos bovinos à brucelose está relacionada a espécie, biovariedade e cepa de *Brucella* sp., ao tipo de exploração pecuária, a presença de reservatórios no ambiente, a idade, sexo e grau de maturidade sexual do hospedeiro, a quantidade de microrganismos no inóculo, a imunidade inata e adquirida de cada indivíduo e ao estágio da gestação (ADAMS, 2002; CAVALLÉRO, 2002; PAULIN, 2003; MONTEIRO et al., 2006).

Para que os animais selvagens sejam considerados na transmissão da brucelose, além do diagnóstico positivo de *Brucella* sp., são necessárias informações sobre a susceptibilidade e resistência nos hospedeiros, a dose de infecção, o grau de contato entre os animais selvagens e domésticos e os fatores ambientais e sazonais que alteram a infecção, buscando demonstrar a adaptação e a sustentabilidade da infecção para que os hospedeiros possam dar continuidade à transmissão do agente (GODFROID, 2002).

A brucelose humana depende da existência dos reservatórios animais, incluindo os de vida livre (GODFROID, 2002) e das características ocupacionais das pessoas acometidas, em que profissionais ligados à cadeia produtiva da carne, consumidores de leite e derivados sem pasteurização, veterinários e laboratoristas são mais susceptíveis. Em ordem decrescente de patogenicidade *B. mellitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. ceti* (ou *B. cetaceae*) afetam o ser humano (PESSEGUEIRO et al., 2003, CORBEL et al, 2006, LUCERO et al., 2008; SELEEM et al., 2010). O homem pode ser o hospedeiro preferencial de uma nova espécie: *B. inopinata*, isolada recentemente de uma infecção num implante de seio numa mulher (SCHOLZ et al., 2009).

Dentre os países que erradicaram a brucelose de seus rebanhos bovinos, somente 10: Austrália, Canadá, Chipre, Dinamarca, Finlândia, Holanda, Nova Zelândia,

Noruega, Reino Unido e Suécia são considerados livres da doença (causada por *B. abortus*) em humanos. Para atingir tal status, todas estas nações sustentaram este panorama por um período de pelo menos cinco anos sem a ocorrência de casos novos (SELEEM, 2010).

2.2.2.3 Transmissão

A principal fonte de infecção para a brucelose em bovinos e animais selvagens são as fêmeas gestantes infectadas, que ao abortarem ou parirem eliminam grandes quantidades de *Brucella* sp. no ambiente, contaminando pastagens, água e solo (OMS, 1986; CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998; BRASIL, 2006). Uma vaca que abortou por brucelose pode permanecer por até 30 dias eliminando o patógeno no ambiente (BRASIL, 2006). Em regiões, como o Pantanal Sul-mato-grossense, os bovinos convivem com o veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) e ambos se alimentam das mesmas pastagens e cursos de água. Assim como no bovino, a principal forma de transmissão da brucelose nestes cervídeos é a digestiva (WITTER, 1981; UHART et al., 2010), através da ingestão de água ou de pastagens contaminadas com secreções ou tecidos infectados por *Brucella* sp.

Os bovinos possuem outras importantes vias de infecção, como a aerógena e o contato direto de *Brucella* sp. com as mucosas conjuntivas (BRASIL, 2006; PAULIN, 2003). A transmissão pela monta natural tem pouca ou nenhuma importância para os bovinos, pois a vagina possui defesas naturais eficientes para eliminar a *Brucella* sp. Entretanto, na inseminação artificial existe o risco da infecção iatrogênica, já que o sêmen é depositado diretamente no útero (LAGE, 2008).

Há um papel secundário na transmissão e manutenção da brucelose nos rebanhos que é desempenhado por vetores hematófagos. Moscas-do-chifre, ao se alimentarem do sangue de animais infectados durante o período de bacteriemia, transportam e excretam *Brucella* sp. nas fezes (WITTER, 1981; WALKER, 2003).

As vacas brucélicas transmitem o patógeno aos bezerros pelo leite ou ainda podem parir bezerros infectados na vida intra-uterina. Isto ocorre principalmente em vacas que já abortaram por brucelose em gestações anteriores e tornaram-se resistentes à doença. Se o animal parido nesta situação for uma fêmea, esta tende a abortar em sua primeira prenhez, apresentando soropositividade tardiamente somente em estágios avançados da gestação (BRASIL, 2006).

A via digestiva é a principal porta de entrada de *B. abortus* para os ungulados selvagens, mas a infecção também pode ocorrer pelo contato direto das mucosas nasal, oral, conjuntival, vaginal ou retal com a bactéria. Para *B. ovis* a via de infecção venérea é a mais importante, essencialmente para os cervídeos machos onde esta bactéria encontra seus locais de predileção (testículos e epidídimo) para a instalação no organismo (MACKINTOSH et al., 2002). A rena (*Rangifer tarandus*) é um cervídeo que constitui o principal animal doméstico nas regiões árticas do Canadá, Rússia e EUA (Alasca). Nesta espécie é muito importante a infecção por *B. suis* biovar 4, que constitui uma zoonose e ocorre pelas mesmas rotas de transmissão da *B. abortus*. As renas são as únicas espécies de ruminantes que atuam comprovadamente como reservatórios e disseminadores para a *B. suis* (OMS, 1986).

No Pantanal sul-mato-grossense o cervídeo mais abundante é o veado-campeiro que vive em simpatria com os bovinos domésticos locais, compartilhando das pastagens, habitats e outros recursos (LACERDA, 2008). Esta íntima relação entre bovinos e cervídeos pode favorecer o “spillover” (transbordamento) de patógenos de uma população para outra. Apesar de terem sido realizados inquéritos epidemiológicos para a brucelose nestes animais, até o presente momento o potencial e as rotas de transmissão na interface bovinos/veado-campeiro são desconhecidos.

A maioria dos casos de transmissão da *Brucella* sp. para o homem ocorre por via digestiva a partir do leite e derivados não pasteurizados. Carnes mal cozidas, essencialmente as que possuem ossos com medula são também importantes fontes de infecção. O contato direto das mucosas oral, respiratória ou conjuntiva e da pele escarificada com o ambiente ou com as secreções de animais infectados permite a entrada da bactéria no corpo humano. Deve-se ter cuidado ao manipular *Brucella* sp. em laboratórios, pois tanto a inalação como a inoculação acidental de cepas, incluindo as vacinais, são vias de infecção para o homem. Com relação à transmissão humano-humano, a via sexual e a amamentação de bebês já foram descritas como potencialmente possíveis, apesar de serem raras (OMS, 1986; PESSEGUEIRO et al., 2003; CORBEL et al., 2006; SELEEM et al., 2010).

2.2.3 Fisiopatogenia e resposta imune

Ao penetrar no organismo do hospedeiro, pelas mucosas externas ou pela via digestiva, as bactérias do gênero *Brucella* sp. realizam um curto período de bacteremia, logo sendo capturadas e transportadas por células fagocitárias até os linfonodos regionais (COSTA, 2001). Ao entrar em contato com receptores dos macrófagos que regulam a fixação e apreensão de bactérias, *Brucella* sp. inibe a fusão com os fagolisossomos intracelulares dos macrófagos, podendo então se multiplicar no retículo endoplasmático rugoso (DELRUE et al., 2004).

O LPS com a cadeia “O” lateral, presente nas cepas lisas de *Brucella* sp. inibe a fagocitose, protege contra a morte bacteriana dentro do fagolisossoma e contra a apoptose da célula hospedeira. Proteínas de estresse (chaperonas) são produzidas em *Brucella* sp., protegendo contra enzimas hidrolíticas e radicais de oxigênio como o superóxido que são produzidos pelo hospedeiro. O sistema de secreção tipo IV, através do operon *virb* é o principal fator de virulência de *Brucella* sp., atuando na penetração da bactéria nos macrófagos, evitando a fusão dos fagossomos com os compartimentos lisossomais, realizando a captação rápida de lipídeos para a evasão e de nutrientes do citosol macrofágico, além de regular a reprodução intracelular de *Brucella* sp. Este sistema de secreção parece atuar durante as 12 primeiras horas de internalização de *Brucella* sp. nos macrófagos, protegendo as bactérias dos fagolisossomos até que estas atinjam o retículo endoplasmático para se reproduzirem, então a participação deste sistema é reduzida até a desativação (GORVEL e MORENO, 2002; KÖHLER et al., 2002; DELRUE et al., 2004).

Perante aos mecanismos de patogênese da *Brucella* sp., o organismo do hospedeiro responde principalmente com a resposta imune mediada por células fagocitárias (macrófagos), neutrófilos e linfócitos-T auxiliares e citotóxicos, sendo esta a principal forma de defesa para o controle de microrganismos intracelulares. Apesar de ser menos eficiente, a imunidade humoral também é mobilizada e os linfócitos B ativados produzem imunoglobulinas das classes IgG1 e 2, IgM e IgA específicas anti-LPS da membrana celular de *Brucella* sp. (OMS, 1986; BRASIL, 2006).

Após multiplicarem-se nos macrófagos, bactérias *Brucella* sp. intracelulares ou livres localizadas nos linfonodos regionais são disseminadas por via hematógena e linfática, instalando-se principalmente nos órgãos ricos em células do sistema reticuloendoleial (mononuclear fagocitário) como o baço, fígado e linfonodos

(PAULIN, 2003). Em ruminantes gestantes brucélicos há um tropismo pelos placentomas, devido ao aumento da produção do açúcar eritritol, utilizado pela bactéria em suas funções metabólicas (ESSENBERG et al., 2002).

Quanto mais avançada é a gestação, maior é a probabilidade de infecção do útero gravídico (BRASIL, 2006). Nos casos agudos costuma ocorrer a placentite necrosante, devido à destruição dos placentomas por endotoxinas brucélicas, onde há o descolamento das vilosidades que unem as carúnculas uterinas aos cotilédones placentários, comprometendo o aporte sanguíneo ao feto, prejudicando a respiração e nutrição e, por fim causando a consequente morte fetal (WALKER, 2003; PAULIN, 2003; ANDERSON, 2007). Nos casos crônicos quando as lesões necrosantes são menores, ocorre maior deposição de fibrina nas vilosidades dos placentomas e maior possibilidade de retenção da placenta num eventual parto ou aborto, pois dificilmente a placenta se descola do útero quando as vilosidades estão cicatrizadas (PAULIN, 2003). O feto também pode ser diretamente infectado e morto por endotoxinas de *Brucella* sp. ou o parto prematuro pode ser induzido devido ao estresse fetal resultante da inflamação dos tecidos placentários (ADAMS, 2002; WALKER, 2003).

Diferentemente dos ruminantes e suínos, o homem, roedores, equinos, e lagomorfos (coelhos) não produzem o eritritol em níveis detectáveis na placenta, testículos, articulações e glândula mamária. Esta particularidade fisiológica pode explicar a menor predileção de *Brucella* sp. pelos tecidos placentários durante a gestação nestas espécies (RIBEIRO et al., 2008). Contudo, existem outros carboidratos como o glicerol e as hexoses produzidos nos órgãos reprodutores que *Brucella* sp. pode utilizar como fonte energética. No processo de obtenção da cepa de *B. abortus* B19 houve mutações (especialmente no gene *ery*) que comprometeram a capacidade de metabolizar carboidratos essenciais para a biossíntese do LPS de membrana, responsável por parte da virulência (ESSENBERG et al., 2002)

As artrites sépticas e a migração de *Brucella* sp. para as glândulas mamárias também estão associadas à cronicidade da doença nos bovinos (ADAMS, 2002; LAGE et al., 2008). Nos machos, as lesões nos testículos, epidídimos e glândulas acessórias podem ser uni ou bilaterais e são causadas por reações inflamatórias necrosantes (OMS, 1986; PAULIN, 2003).

Existem poucos trabalhos sobre a fisiopatogenia da brucelose nos mamíferos selvagens susceptíveis, mas em geral os mecanismos de infecção e o desenvolvimento da doença no organismo são semelhantes aos descritos para as espécies domésticas. A

doença costuma se manifestar respeitando os fatores reguladores como a espécie e cepa de *Brucella* sp., o estágio da gestação, a quantidade de bactérias no inóculo infectante, a taxa de contato com os reservatórios e as características de resistência dos hospedeiros (TESSARO et al., 1990; BEVINS et al., 1995; USDA, 2008; DAHOUK et al., 2005).

Assim como nos demais ungulados, os cervídeos possuem células trofoblásticas que produzem o eritritol em altas quantidades durante a gestação, atraindo *Brucella* sp. dos linfonodos regionais para o útero. A placenta dos cervídeos é do tipo oligocotiledonária com no máximo dez placentomas (variando entre 3 e 6 na maioria das espécies) diferindo dos bovinos, ovinos e caprinos, onde a quantidade destas estruturas costuma ser 10 vezes maior (BENIRSCHKE, 2005). Este pode ser um agravante anatômico na infecção uterina por *Brucella* sp., onde o comprometimento de apenas um placentoma pode significar uma defasagem de 10 a 33% de aporte sanguíneo materno para o feto.

Nos cervídeos pode haver a inflamação com necrose da placenta que leva ao aborto por *Brucella* sp. (MACKINTOSH et al., 2002). Além do útero, ocorre multiplicação bacteriana no úbere das fêmeas (UHART et al., 2010) e nos testículos e epidídimos dos machos, especialmente nas infecções por *B. ovis*, causando inflamações e fibrose (RIDLER, 2001).

2.2.4 Sintomatologia e alterações anatomo-histopatológicas

As manifestações clínicas principais da brucelose estão associadas às lesões no sistema reprodutivo e animais adultos dificilmente apresentam sinais sistêmicos (WALKER, 2003). A ocorrência do aborto no terço final da gestação é o sintoma clássico da infecção por *B. abortus* tanto nos bovinos, como nos ruminantes selvagens (KREEGER et al., 2002; ANDERSON, 2007). Sintomas típicos como a repetição do cio, a retenção da placenta, descargas uterinas e o nascimento de crias fracas foram reportados em bisões e cervídeos com *Brucella* sp. (KREEGER et al., 2002; MACKINTOSH et al., 2002; USDA, 2008). A placentite necrosante é a principal lesão macroscópica encontrada na brucelose dos ruminantes (PAULIN, 2003).

Nos machos de várias espécies de cervos, veados, renas e caribús existem relatos de sub-fertilidade, orquite, epididimite e inflamação das glândulas anexas sexuais nas

infecções por *B. abortus* e *B. ovis* (OMS, 1986; RIDLER, 2001; MACKINTOSH et al., 2002; UHART et al., 2010).

A *Brucella suis* biovar 4 em cervídeos pode causar aborto, infertilidade e lesões supurativas ou não na articulação carpal, linfonodos, glândula mamária e testículos. Também há relatos de abscessos subcutâneos, musculares, hepáticos, renais e na parede do rúmen. Esta brucelose dos cervídeos é uma grave zoonose para as pessoas que convivem e se alimentam destes animais no Alasca, Canadá e Sibéria (FORBES, 1991; MACKINTOSH et al., 2002). Algumas espécies como o veado-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e *Odocoileus hemionus* são relativamente resistentes à infecção por *B. abortus* (MACKINTOSH et al., 2002; UHART et al., 2010).

Em humanos, a brucelose aguda é caracterizada por febres ondulantes (de 37°C pela manhã até de 40°C nas tardes), debilitação, dores musculares e articulares, sudorese noturna com odor peculiar e seguida de calafrios e esplenomegalia. Reações alérgicas do tipo exantemas papulares ou pustulares causadas pelo contato com *Brucella* sp. podem surgir no braço de veterinários que realizam diagnóstico de gestação ou procedimentos obstétricos sem os devidos cuidados (OMS, 1986; CORBEL, 2006; SELEEM et al., 2010).

Como complicações da doença ocorrem osteoartrites, diarreias, peritonite, linfadenopatia paratraqueal, hepatite infecciosa, orquite e epididimite, aneurisma meningoencefalite e aborto por bacteremia especialmente no terço inicial da gestação, diferente dos ungulados a placenta da mulher não é cotiledonária e não produz eritritol. Pode haver morte por toxemia ou pelas consequências da trombocitopenia e endocardite. Os casos são considerados crônicos quando os sintomas iniciais permanecem por mais de 12 meses a partir do diagnóstico, a depressão e angústia são comuns com a manutenção dos sinais inespecíficos de febre, dores de cabeça e resfriados (OMS, 1986; CORBEL, 2006;).

2.2.5 Diagnóstico

2.2.5.1 Métodos Indiretos - Testes sorológicos

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) regulamenta como oficial para os bovinos o teste do Antígeno

Acidificado Tamponado (AAT) para a triagem dos animais e do 2-ME (2-mercaptoetanol) como prova confirmatória (BRASIL, 2006).

Em cervídeos e outros ungulados selvagens este método de diagnóstico vem sendo bastante utilizado em estudos de prevalência da brucelose, principalmente na sua apresentação em cartões impregnados com o antígeno acidificado de *B. abortus* (“*card test*”) (AGUIRRE et al., 1995; MATHIAS et al., 1999; COOK et al., 2002; USDA, 2008).

A prova do AAT é um método indireto e qualitativo de diagnóstico, baseado na reação de aglutinação entre o antígeno, uma cepa laboratorial de *Brucella abortus* (S99 ou S11119.3) e as imunoglobulinas (Ig) ativadas presentes no soro sanguíneo do hospedeiro. A aglutinação pode ser visualizada sob retroiluminação em placa de vidro com o auxílio do corante rosa-bengala ou diretamente no *card test*, indicando a interação do antígeno com a IgG₁. O pH ácido (3,65) da solução do AAT reduz as reações de aglutinação inespecíficas causadas pelo isótopo IgM (NIELSEN, 2002; BRASIL, 2006).

O 2-mercaptoetanol (2-ME) é um teste diagnóstico qualitativo que fornece os resultados na forma de títulos de diluição seriada (25, 50, 100 e 200), sendo utilizado para a confirmação das amostras positivas pelo AAT para a brucelose em bovinos (BRASIL, 2006). Nesta prova redutora de anticorpos inespecíficos, são adicionados agentes com o radical “tiol” no diluente do soro a ser testado, promovendo a quebra das IgM inespecíficas em unidades monoméricas incapazes de promover a aglutinação, restando apenas as IgG indicativas de infecção crônica de *Brucella* sp. (NIELSEN, 2002; BRASIL, 2006).

Segundo o PNCEBT a prova de 2-ME deve ser realizada em paralelo com a prova de Soroaglutinação Lenta em Tubos (SALT), permitindo a diferenciação dos soros com predomínio de IgM indicativa de infecção recente, vacinação ou reação inespecífica (BRASIL, 2006). São então adicionados os antígenos de *B. abortus* e os soros dos animais em ambos os tubos, conforme as diluições preconizadas todas as amostras são incubadas por 48 horas. A interpretação da prova baseia-se na avaliação visual da solução incubada sob iluminação, onde na presença de anticorpos o soro testado torna-se translúcido devido à formação de imunocomplexos que se apresentam como grumos brancos insolúveis (BRASIL, 2006).

O teste de redução de anticorpos mais utilizado em cervídeos na América do Norte é o Rivanol, sendo incorporado aos programas de controle de *Brucella* sp. destes

animais nos EUA e no Canada (CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998; USDA, 2003). Assim como o 2-ME, o Rivanol segue os mesmos princípios de funcionamento, precipitando por redução os agentes que interferem no teste de aglutinação sem eliminar os anticorpos vacinais, o que pode gerar resultados falsos positivos (NIELSEN, 2002).

Dentre as provas indiretas para o diagnóstico da brucelose o Ensaio de Polarização Fluorescente (*“Fluorescence Polarization Assay”* - FPA) desponta como um dos testes com melhores taxas de sensibilidade e especificidade, sendo inclusive validado para algumas espécies de grandes cervídeos da América do Norte (GALL et al., 2001). O PFA foi inicialmente desenvolvido para bovinos e baseia-se na preparação de um antígeno da cadeia “O” do LPS de *B. abortus* (cepa 1119.3) conjugado com uma molécula de isotiocianato de fluoresceína (marcador fluorescente). Este antígeno com o marcador é adicionado ao soro a ser testado numa solução previamente estandarizada em equipamento próprio para PFA. Na presença de anticorpos anti-cadeia “O” do LPS, formam-se imunocomplexos que ficam com maior peso molecular que o dos antígenos isolados (NIELSEN et al., 2000; BRASIL, 2006).

Apesar dos métodos sorológicos de diagnóstico para brucelose nas espécies selvagens terem sido ainda pouco estudados e quase sempre não validados, eles têm sido apontados como importantes ferramentas presuntivas na avaliação da exposição ou não destes animais aos patógenos. O ideal num programa de monitoramento da brucelose na fauna seria efetuar em paralelo as provas sorológicas e o isolamento bacteriano, relacionando os resultados obtidos com os casos clínicos, sub-clínicos e crônicos nos animais (GODFROID, 2002).

2.2.5.2 Métodos Diretos - Testes moleculares

O uso das tecnologias moleculares de detecção do DNA, sobretudo a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), desponta como uma alternativa promissora e eficiente para o diagnóstico da brucelose (BRICKER, 2002).

A PCR tem sido utilizada no homem, nos animais domésticos e em alguns alimentos para a detecção da brucelose, sendo um método bastante sensível, específico, rápido e seguro (QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; BRICKER, 2002a; MYIASHIRO et al., 2007). Contudo, dentre os animais selvagens esta técnica de diagnóstico foi ainda pouco explorada, provavelmente devido ao alto grau de investimento que a sua

implantação demanda e a falta da padronização da técnica para estas espécies e seus patógenos.

Com a PCR pode-se detectar o DNA de *Brucella* sp. em amostras de sangue, em fetos abortados diretamente dos tecidos, no ambiente ou mesmo em alimentos já processados (BRICKER, 2002a; CORTEZ et al., 2006; MIYASHIRO et al., 2007). Esta é uma clara vantagem em relação às provas sorológicas e ao isolamento *in vitro*, método de “diagnóstico ouro” para a brucelose, que necessitam de materiais específicos e em boa qualidade para que seus resultados não sejam comprometidos, seja por reações cruzadas ou por contaminação. A PCR ainda, evita o risco de infecção por manipulação de *Brucella* sp. no cultivo bacteriano *in vitro* e é um método mais rápido de diagnóstico que o isolamento (QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; BRICKER, 2002a).

Dependendo dos objetivos, a PCR pode ser utilizada como uma prova diagnóstica de triagem altamente sensível e específica para o gênero *Brucella* sp. ou ser uma ferramenta precisa para a caracterização das espécies, biovars e até mesmo das cepas de laboratórios através de suas diferenças genéticas. Com relação ao primeiro caso, diversos testes tem sido desenvolvidos para a identificação rápida de *Brucella* sp. a partir de um locus específico para o gênero (BRICKER et al., 2002b).

O uso de sequências de iniciadores localizadas em regiões específicas do gene *16S rRNA* tem se mostrado eficiente para a detecção de *Brucella* sp. isoladas em laboratório, apesar de que em alguns casos podem ocorrer reação cruzada na presença da bactéria *Ochrobactrum anthropi* biótipo D, que é geneticamente relacionada a *Brucella* sp. (ROMERO, et al., 1995). O *operon virB* possui 12 genes que codificam o sistema de secreção tipo IV, responsável pela multiplicação e sobrevivência da *Brucella* sp. durante a sua vida intracelular. Tais genes possuem regiões que foram preconizadas na eleição de *primers* que apresentaram ótimos desempenhos na detecção de *Brucella* sp., sendo testadas em DNA extraído de colônias isoladas em laboratório (ROUOT et al., 2003; HARTIGH et al., 2004; HARTIGH et al., 2008) e em material clínico (ELISEI et al., 2010).

Com *primers* desenhados para sequências do gene *BCSP31* que codifica uma proteína periplasmática antigênica sem função conhecida, a reação da PCR obteve eficiência em amostras clínicas, mais precisamente sangue periférico (QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997), tendo capacidade para detectar todas as espécies do gênero *Brucella* sp. (BRICKER, 2002a)

Quanto a diferenciação das espécies e biovars de *Brucella* sp., a PCR AMOS teve destaque pela utilização de um *multiplex* de *primers*, sendo batizada com as iniciais das espécies que detecta (*B. abortus* biovars 1, 2 e 4, *B. melitensis* biovars 1, 2 e 3, *B. ovis* e *B. suis* biovar 1). Esta técnica se baseia no uso de quatro *primers* específicos para as *Brucella* spp. citadas e um outro *primer* para o elemento *IS711*. O número de localizações em que a sequência múltipla *IS711* está inserida no cromossomo das diferentes espécies de *Brucella* sp., gera um produto com diferentes tamanhos de *amplicons* (BRICKER e HALLING, 1994). Mais tarde, outras técnicas de PCR *multiplex* complementaram e melhoraram a PCR AMOS, adicionando a esta os *primers* que faltavam para as espécies e biovars de *Brucella* sp. (OCAMPO-SOSA et al., 2005; MINHARRO et al., 2009; MAYER-SCHOLL et al., 2010).

No diagnóstico da brucelose através da PCR é possível diferenciar o DNA das cepas vacinais B19 e RB51 de *B. abortus* do DNA das demais espécies *Brucella* sp. Tal diferenciação pode ser observada ao se utilizar os *primers* *ery1/ery2*, desenhados para o gene *ery* que é responsável pelo metabolismo e aproveitamento do eritritol. Quando a sequência de nucleotídeos do gene *ery* é amplificada em todas as espécies selvagens de *Brucella* sp. ou na cepa vacinal rugosa *B. abortus* RB51, os *amplicons* formados possuem 1063 (pares de base) pb, diferentemente da cepa vacinal lisa *B. abortus* B19, que possui fragmentos de somente 361 pb amplificados para o gene *ery*, o qual sofreu uma mutação que promoveu a deleção de 702 pb em sua sequência de DNA (BRICKER e HALLING, 1995; EWALT e BRICKER, 1995 MYIASHIRO et al., 2007).

Outra PCR desenvolvida para a diferenciação da cepa vacinal *B. abortus* RB51 das demais *Brucella* sp. tem como referência o gene *wboA* que codifica a glicosiltransferase responsável pela síntese da cadeia “O” do LPS de membrana. A cepa *B. abortus* RB51 é do tipo rugosa e foi atenuada a partir de *B. abortus* 2308 lisa, onde no processo de derivação ocorreu a interrupção da cadeia de nucleotídeos do gene *wboA* pela inserção do elemento genético *IS711*, com 842 pb. Explorando essa diferença de nucleotídeos em *B. abortus* RB51, foram desenhados *primers* que amplificam aproximadamente 400 pb para todas as espécies e cepas de *Brucella* sp., exceto *B. abortus* RB51, que devido a inserção do elemento *IS711* irá amplificar produtos de aproximadamente 1300 pb ($\approx 400 \text{ pb} + 842 \text{ pb}$) (VEMULAPALLI, 1999).

As PCRs multiplex podem ser utilizadas com DNA extraído diretamente de tecidos biológicos ou para o diagnóstico diferencial entre patógenos de gêneros diferentes, como é o caso do aborto perinatal em bovinos (RICHTZENHAIN et al.,

2002). As aplicações *post mortem* também são possíveis para a PCR, tanto tempo quanto perdurar a viabilidade do DNA que se preconiza (CORTEZ et al., 2006). Esta característica é muito importante para os animais selvagens que demandam grandes esforços e recursos para serem capturados no monitoramento e vigilância de doenças. Desta forma, mesmo os animais mortos nas estradas ou em outras situações poderiam fornecer valiosas informações epidemiológicas sobre a brucelose (BENGIS, 2002).

2.2.6 Tratamento

Não há tratamento específico para a brucelose em cervídeos devendo ser preconizadas as medidas de controle profilático e epidemiológico (CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998). O rifle sanitário no caso de surtos descontrolados foi regulamentado, porém não utilizado em países que incluem as espécies selvagens em seus programas sanitários de vigilância, contrabalançando a importância político-econômica da doença para a cadeia produtiva da carne e leite, a saúde pública no caso dos surtos em humanos e o valor ecológico dos reservatórios selvagens (USDA, 2003). Na América do Sul, os estudos parecem apontar para uma baixa participação dos cervídeos como reservatório natural na ecoepidemiologia da *Brucella* sp. por fatores que precisam ainda ser esclarecidos (UHART et al., 2010).

2.2.7 Vacinação

A vacina B19 é uma cepa lisa, viva e atenuada de *B. abortus* biovar 1 que foi originalmente obtida em 1923 por um pesquisador americano chamado John M. Buck, que a isolou do leite de uma vaca Jersey que apresentava sinais de infertilidade. A *B. abortus* virulenta ficou esquecida no laboratório exposta à temperatura ambiente por cerca de um ano, quando então o pesquisador a testou em cobaias e constatou que ela era altamente imunogênica (SCHURIG et al., 2002; POESTER, 2006).

Especula-se que no processo de atenuação a cepa B19 ocorreram mutações que reduziram a afinidade e a capacidade de metabolização do eritritol. A característica imunogênica desta cepa, manteve-se devido a manutenção da cadeia “O” no LPS da membrana, estimulando a produção de anticorpos (SCHURIG et al., 2002).

Inicialmente desenvolvida para a pré-imunização do gado, a B19 é utilizada na América do Norte para a vacinação dos cervídeos desde 1980, na forma de “bio-balas” contendo um preparado liofilizado com a dose reduzida de $3,6 \times 10^7$ a $7,6 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias (CFU) de *Brucella* sp. vivas (DAVIS e ELZER, 2002). Os animais são então alvejados à distância por meio de rifles de gás comprimido, sendo que cerca de quarenta mil indivíduos já foram vacinados (COOK et al., 2002). A eficiência deste programa é considerado controversa, pois não há como controlar se um animal foi vacinado mais de uma vez, se a dose foi completamente administrada, se o animal tinha a faixa etária ideal de 3 a 10 meses e se não estava gestante. São necessários testes para determinar a prevalência da brucelose com o programa vacinal e para avaliar eventuais problemas clínicos, reprodutivos e ecológicos nestas populações de cervídeos (CHEVILLE e McCULLOUGH, 1998; DAVIS e ELZER, 2002).

A cepa mutante rugosa RB51 foi originada da *B. abortus* 2308 por um processo de resistência a rifampicina. Ela perdeu a cadeia “O” lateral do LPS e manteve esta característica coconservada mesmo após várias passagens *in vitro* e *in vivo* em várias espécies animais (SCHURIG et al., 2002).

Nos cervídeos a RB51 foi testada por dois autores na região do Parque do Yellowstone. O primeiro concluiu que a dose ativa de proteção parece ser mais alta que a utilizada em bovinos, em alguns casos a vacina parece causar o aborto, a via oral de vacinação parece ser melhor que a sub-cutânea (COOK et al., 2002). A utilização da dose parenteral para a RB51, não é encorajada pelos resultados obtidos, pois a proteção contra os abortos não foi superior à encontrada nos grupos controle não vacinados (KREEGER et al., 2002).

2.3 Leptospirose

2.3.1 Importância

O homem, animais domésticos e selvagens são afetados pela leptospirose (STEELE, 1959; FAINE et al., 1999; VIEIRA, 2009; UHART et al, 2010).

A leptospirose é um problema de saúde pública mundial. Nas áreas tropicais e subtropicais úmidas o impacto desta doença é ainda maior por influência do clima e

ambiente. Condições inapropriadas de saneamento básico e catástrofes naturais propiciam a infecção humana. De acordo com a ocupação profissional, os trabalhadores podem ter maiores ou menores taxas de contato com as leptospiras. Para o turismo de aventura, esportes ou atividades de lazer realizados em ambientes aquáticos, esta doença é potencialmente importante (WHO, 2003).

Além da saúde e do bem-estar de animais domésticos serem comprometidos pela leptospirose, é atribuído a esta doença o aumento dos custos de produção decorrente de problemas na esfera reprodutiva, como o aborto, nascimento de crias fracas, aumento do intervalo entre partos, repetição deaios, redução na produção de leite e o aumento das despesas com os serviços veterinários, medicamentos, vacinas e vigilância sanitária (LILEMBAUM e SOUZA, 2003; WHO, 2003; MINEIRO et al., 2007).

Os animais selvagens atuam como reservatórios naturais para as diferentes sorovares que causam a leptospirose (FAINE et al., 1999). Os roedores são importantíssimos na epidemiologia desta doença em humanos (HERBETREAU et al., 2005; CORRÊA, 2007). Para os cervídeos a sorovar pomona tem se mostrado altamente virulenta, estando relacionada com os casos superagudos de leptospirose, causando a “Síndrome Hemolítica Fatal” principalmente em fêmeas gestantes e em filhotes. Já a sorovar hardjo causa a leptospirose crônica em cervídeos, sendo responsável por abortos e outras falhas reprodutivas (MACKINTOSH et al., 2002).

Dois importantes fatores reguladores do tamanho de uma população selvagem: o aumento da mortalidade e a supressão reprodutiva (WOBESER, 2006), são desencadeados pela leptospirose em cervídeos.

2.3.2 Microbiologia

Pertencendo a ordem *Espirochaetales* e família *Leptospiraceae*, as bactérias do gênero *Leptospira* sp. são alongadas e espiraladas (helicoidais), com dimensões de 0,1 x 6 a 20 µm, possuindo um flagelo periplasmático (endoflagelo) que atravessa longitudinalmente o microrganismo e liga as duas extremidades que ficam com aspecto de gancho (QUINN et al., 2005, LEVETT, 2001). São portanto móveis e apesar de Gram negativas, se coram mal por esta técnica, necessitando de impregnação pela prata, complexação com anticorpos fluorescentes e/ou microscopia de campo escuro para serem melhor visualizadas (LE FEBVRE, 2003). As taxa de guanina + citisina no DNA de *Leptospira* sp. oscila entre 33,5 ± 0,2 e 43,3% (FAINE et al., 1999).

As leptospiros são aeróbias estritas, com temperatura ótima para o crescimento entre 28 e 30°C e tempo inter-gerações (durante a fase de crescimento exponencial) entre 6 a 12 horas (LEVETT, 2001; WHO, 2003). Não há crescimento nos meios de rotina, sendo necessário o uso de soluções enriquecidas com albumina sérica, vitaminas B₂ e B₁₂, sais de amônio e ácidos graxos de cadeia longa. O meio mais comum para o isolamento é o *Fletcher*, que é enriquecido com o soro de coelho (em concentrações de até 10%) e promove a multiplicação das leptospiros caracterizada por uma zona turva, meio centímetro abaixo do menisco da superfície, chamado *Anel de Dinger* (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; QUINN, 2005).

As temperaturas inferiores a 13 °C e em torno de 40 °C inibem a multiplicação ou destroem as leptospiros, inclusive durante a febre nos hospedeiro. Estas bactérias são sensíveis à ambientes em decomposição, ao dessecamento, pH menor que 6,8 ou maior que 8 e a exposição à maioria dos agentes desinfetantes (FAINE et al., 1999; WHO, 2003). Os ambientes aquáticos e solos úmidos a temperatura de 20 °C mantém as leptospiros viáveis fora do hospedeiro (CORRÊA, 2007).

O gênero *Leptospira* sp. foi inicialmente organizado em duas espécies, *L. interrogans*, compreendendo as cepas patogênicas e *L. biflexa*, contendo as cepas saprófitas e de vida livre. Tais cepas foram classificadas por critérios antigênicos, onde as diferentes proporções entre títulos homólogos de aglutinação que apresentavam, quando expostas à anticorpos monoclonais de coelhos, as caracterizava como sorovares distintas. Devido às semelhanças antigênicas e a sua utilidade como ferramenta epidemiológica, os sorogrupos foram propostos para agrupar diferentes sorovares de *L. interrogans* (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Com base nas técnicas de hibridização do DNA, a classificação foi revista, sendo o gênero *Leptospira* sp. organizado em 17 espécies (genomospécies). Mais tarde, foi constatada diversidade genética entre cepas dentro de uma mesma sorovar, o que caracterizou os sorotipos (VAN EYE et al., 1991, LEVETT, 2001). Com tantas propostas, a organização taxonômica das leptospiros tornou-se bem complexa, como por exemplo o sorovar harjo, ocorre para duas espécies geneticamente diferentes, *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*, porém antigenicamente semelhantes (mesmo sorogrupo), culminando em dois sorotipos: hardjobovis e hardjoprajitno (LEVETT, 2001).

Para fins clínico-epidemiológicos as sorovares constituem a unidade taxonômica de maior importância das leptospiros (FAINE et al., 1999; WHO, 2003), pois as

providências orientadas pelo diagnóstico serão direcionadas para estas, seus hospedeiros e ambiente de ocorrência.

Ao contrário das espécies patogênicas, as saprófitas podem crescer na presença de 8-azaguanina (225 mg/l), em até 13 °C e apresentarem formas esféricas na presença de 1 M de NaCl. Esta diferenciação é epidemiologicamente importante porque algumas espécies comensais podem apresentar sorotipos de sorovares patogênicas, confusão gerada devido a classificação antigênica (WHO, 2003).

2.3.3 Epidemiologia

2.3.3.1 Distribuição e ocorrência

A leptospirose é uma doença cosmopolita, com maior prevalência nas regiões tropicais do planeta, onde há altas taxas pluviométricas e solos de pH alcalino a neutro (CORRÊA, 2007). Embora as leptospiros tenham ampla distribuição, as suas sorovares tendem ser limitadas regionalmente, estando associadas à ocorrência de seus hospedeiros-reservatórios naturais (QUINN et al., 2005).

A partir da manutenção do patógeno nos reservatórios, pode então ocorrer o processo epidemiológico de *spill over* (transbordamento) para outros hospedeiros não habituais (MACKINTOSH et al., 2002). A leptospirose pode ter tanto um caráter endêmico como epidêmico para o homem e animais, sendo fortemente influenciada pelo ambiente. A densidade dos reservatórios, a taxa de contato interespecífica e a sazonalidade climática são fatores determinantes da variação nas frequências desta doença (LEVETT, 2001; WHO, 2003).

No Brasil, os sorovares hardjo e wolffi são predominantes em bovinos, porém diversos outros sorovares foram diagnosticados por isolamento e tipificação, ou presuntivamente por testes sorológicos (LEMOS e ALMEIDA, 2005). No Pantanal do Mato Grosso do Sul, a prevalência estimada para a leptospirose em bovinos é de 38,8%, variando de 10 a 84% entre rebanhos, e as sorovares mais frequentes são harjo, sejo e wolffi (PELLEGRIN et al., 1999).

Levantamentos da leptospirose no veado-campeiro estimaram diferentes prevalências de 24% (MATHIAS et al., 1999) e 9,7% (GIRIO et al., 2004) na região da Nhecolândia no Pantanal, sendo diagnosticadas as sorovares hardjo, wolffi e mini em

ambos os estudos. Estes resultados são maiores que os de outras regiões do Brasil, como o Parque Nacional das Emas localizado no planalto central brasileiro, onde não foram encontrados veados-campeiros soropositivos para a leptospirose (MATHIAS et al., 1999).

De acordo com as espécies pesquisadas as prevalências podem ser influenciadas por múltiplos fatores de risco, como por exemplo, no homem: a ocupação profissional, hábitos de higiene, atividades de lazer, saneamento básico e sinantropismo (WHO, 2003); nos animais domésticos: aptidão produtiva, hábitos naturais, alimentação, contato interespecífico, práticas de manejo e assistência veterinária (ALONSO-ANDICOBERRY et al., 2001; LILEMBAUM e SOUZA, 2003); nos animais selvagens: introdução de espécies exóticas e domésticas, vacinação dos rebanhos domésticos, hábitos naturais e a natureza do hospedeiro (MACKINTOSH et al., 2002; UHART et al., 2010).

2.3.3.2 Hospedeiros e reservatórios

A *Leptospira interrogans* acomete vários grupos taxonômicos incluindo o homem, mamíferos domésticos e selvagens, répteis e anfíbios, em aves não há descrição de infecção natural, mas quando desafiadas experimentalmente elas respondem com produção de anticorpos competentes na eliminação da bactéria. Outro fator limitante no desenvolvimento da leptospirose nas aves é a temperatura fisiológica de 39 a 42 °C que, como nos estados febris dos mamíferos, destrói a bactéria (FAINE et al., 2002; CORRÊA, 2007).

Certas espécies de animais já desenvolveram relações ecológicas comensais com as sorovares, caracterizando um estado de reservatório natural, no qual as leptospiros mantêm uma infecção crônica dos túbulos renais, sendo eliminada no ambiente sem provocar maiores complicações ao seu hospedeiro (LEVETT, 2001, QUINN et al., 2005). Nestas situações a infecção costuma ocorrer no animal jovem que manifesta respostas sorológicas leves ou então não reagente sorologicamente (falsos negativos), onde a leptospirose costuma ser endêmica e transmitida pelo contato direto entre animais (LEVETT, 2001; WHO, 2003).

Quando não existe uma adaptação para determinada sorovar, a leptospirose costuma causar sérias injúrias aos hospedeiros chamados acidentais, podendo ser fatal em alguns casos (LEVETT, 2001). A distinção entre os reservatórios naturais e

acidentais pode não ser tão clara e é definida pela interação dinâmica das leptospiplas patogênicas com os seus hospedeiros, podendo inclusive ocorrer o surgimento de novas espécies de animais adaptados (WHO, 2003).

2.3.3.3 Transmissão

As fontes de infecção da leptospirose são os hospedeiros naturais das leptospiplas que as elimina no ambiente através da urina, contaminando o solo, água e alimentos (CORRÊA, 2007).

A transmissão no homem e nos animais ocorre pela penetração ativa da bactéria em contato com mucosas, abrasões e ferimentos ou mesmo na pele íntegra amolecida pela água (LEVEET, 2001). Nos bovinos pode haver a transmissão vertical transplacentária, neonatal (durante o parto) ou mamária. Fômites, insetos hematófagos e ingestão de alimentos ou água contaminados também são potencialmente infectantes (FAINE et al., 1999). A transmissão venéria foi descrita em bovinos, ratos, porcos e cães (LE FEBVRE, 2003; WHO, 2003).

Apesar de rara, é possível a transmissão de leptospiplas humano-humano, pelo contato sexual e pela mãe via transplacentária ou durante a amamentação dos bebês. O sangue utilizado nas transfusões, também pode transmitir a doença quando indevidamente controlado. A urina de um paciente com leptospirose é considerada fonte de infecção ambiental (WHO, 2003).

As características zoo-ambientais do Pantanal, tais como o regime sazonal de inundações, e a abundante presença do gado em contato com a fauna (simpatria) (PELLEGRIN et al., 1999; PELLEGRIN e SILVA, 2002; SANTOS, 2002) favorecem a transmissão dos sorovares de *Leptospira interrogans*.

2.3.4 Fisiopatogenia e resposta imune

Os principais mecanismos patogênicos das leptospiplas são: a sua capacidade de adesão celular; a toxidade por sua simples presença no organismo (leptospiplas são potentes antígenos); a citotoxicidade de sua glicoproteína (GPD); a hemólise induzida pelas suas fosfolipases, lipases e hemolisinas; a presença do LPS e seu efeito pirogênico

e imunogênico, promovendo mitoses nos linfócitos B, ativação destes e dos macrófagos e; a indução de respostas auto-imunes (FAINE et al., 1999, LEVETT, 2001).

Nos ruminantes, grupo ao qual pertencem os cervídeos, os fosfolipídeos da membrana plasmática dos eritrócitos possuem ácidos graxos de cadeia longa termoestáveis. Esta é uma particularidade determinante na hemólise causada pela sorovar pomona, que possui fosfolipases tóxicas (hemotoxinas) específicas para este tipo de fosfolipídeos (FAINE et al., 1999).

Após entrarem ativa ou passivamente no hospedeiro as leptospiros atingem a circulação sanguínea sendo espalhadas pelo organismo, embora muitas delas sejam fagocitadas pelos macrófagos regionais hepáticos e pulmonares (FAINE et al., 1999). Essa fase inicial caracteriza o período leptospirêmico (bacteremia) da infecção, que pode durar até dez dias, variando conforme a sorovar e a espécie do hospedeiro infectado (QUINN, 2005; CORRÊA, 2007).

O período de incubação está diretamente relacionado com o tamanho do inóculo infectante, mas é também, influenciado pela sorovar, sua taxa de crescimento no hospedeiro, toxicidade e pela capacidade do hospedeiro em opsonificar as leptospiros (FAINE et al., 1999). Quando os níveis de leptospiremia tornam-se críticos são provocadas lesões pelas toxinas das leptospiros. A primeira lesão no organismo ocorre no endotélio dos pequenos vasos sanguíneos, havendo consequente necrose por isquemia do parênquima de diversos órgãos, de acordo com a localização dos vasos afetados. Nos casos mais severos ocorrem hemorragias e/ou hemólise, acompanhada por icterícia e trombocitopenia (FAINE et al., 1999; CORRÊA, 2007).

Com o desenvolvimento da resposta imune, por volta do quinto ao sétimo dia de infecção, aparecem anticorpos específicos que aglutinam e opsonizam as leptospiros estimulando a fagocitose e eliminação destas do sangue e tecidos. Os danos teciduais podem ser rapidamente reparados mesmo nos casos mais severos, por regeneração (fígado) ou hipertrofia compensatória (rins), ou podem permanecer sequelas por longos períodos (miocardite) até que haja a cicatrização. No caso dos hospedeiros reservatórios, pode haver a recolonização bacteriana dos tecidos renais (FAINE et al., 1999).

Os anticorpos específicos desenvolvidos durante a infecção podem ser transferidos via transplacentária ou pelo colostro aos recém nascidos, (WHO, 2003), porém a imunidade tanto humoral como a celular por fagocitose não são importantes na prevenção de reinfecções (FAINE et al., 1999). Além dos rins, as leptospiros podem

persistir no cérebro ou nos tecidos reprodutores, ou ainda serem seqüestradas por locais específicos, como a câmara anterior ocular, gerando reações de hipersensibilidade com deposição de imunocomplexos no caso de novas infecções (CORRÊA, 2007).

A capacidade de fagocitose dos monócitos e macrófagos é potencializada pela opsonificação quimiotática das leptospiros por anticorpos sorovares específicos ou por qualquer classe de imunoglobulina que reaja contra determinados antígenos LPS (lipopolissacarídeos) de superfície (FAINE et al., 1999). Algumas leptospiros podem evadir da fagocitose na corrente sanguínea, por possível indução da apoptose dos macrófagos (QUINN et al., 2005).

2.3.5 Sintomatologia e alterações anatomo-histopatológicas

Na leptospirose crônica em bovinos e cervídeos, os principais sintomas estão associados às alterações reprodutivas, tais como aborto, natimortos, nascimento de prematuros, neonatos infectados fracos e retenção de placenta (FAINE et al., 1999). Uma característica importante é que o aborto é causado por morte fetal primária e não por infecção placentária (LE FEBVRE, 2003), o que pode auxiliar no diagnóstico diferenciado para brucelose.

Vacas lactantes podem manifestar a “síndrome da diminuição do leite” (LE FEBVRE, 2003). Esta síndrome é caracterizada clinicamente por uma febre passageira, seguida de inapetência e agalaxia com duração de 2 a 10 dias, havendo posterior produção de leite com traços de sangue ou de leite amarelado, de consistência semelhante ao colostro e com alta contagem celular (FAINE et al., 1999).

A infecção pela sorovar pomona pode desencadear a doença aguda em bovinos e cervídeos: caracterizada por febre alta, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão pulmonar, e, ocasionalmente, meningite e morte (FAINE et al., 1999).

Em cervídeos jovens e nas fêmeas gestantes (indivíduos mais susceptíveis) pode haver o desenvolvimento de uma forma superaguda da doença denominada “Síndrome Hemolítica Fatal”, estando relacionada a sorovar pomona e frequentemente levando à morte dos animais (MACKINTOSH et al., 2002; UHART et al., 2010).

As principais lesões decorrentes da leptospirose são a vasculite endotelial, com infiltrado inflamatório de monócitos e neutrófilos, hemorragias, petéquias e icterícia generalizada, principalmente no fígado, rins, coração, e pulmões. Pode haver colestase intra-hepática e eritrofagocitose. A nefrite intersticial é o achado principal, revelando na

histopatologia intensa infiltração celular de monócitos e neutrófilos (LEVETT, 2001). Além destas alterações, os cervídeos podem apresentar edema hemorrágico no tecido subcutâneo e nos tecidos perirrenais e hemoglobinúria (UHART et al., 2010).

Em humanos a mortalidade por leptospirose varia de menos de 5% a até 30% em algumas regiões do mundo, tendo como principais causas a falência renal ou cardiopulmonar e hemorragias generalizadas. Nas infecções durante a gestação pode haver aborto e nascimento de crianças mortas. Os sintomas mais comuns são: febre, dor de cabeça, mialgias, sulfusão conjuntival, icterícia, artralgias, oligúria/anúria, hemorragias, erupções cutâneas, arritmia cardíaca e confusão mental (WHO, 2003).

2.3.6 Diagnóstico

2.3.6.1.1 Testes sorológicos

O diagnóstico de eleição para a leptospirose no homem e nos animais é a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) (BRASIL, 1998; FAINE et al., 1999), porém o ELISA tem sido aperfeiçoado e validado, apresentando-se como uma alternativa bastante sensível e acurada (VANASCO et al. 2001).

Para a realização da SAM é necessário que um laboratório cultive em meios de isolamento específicos as sorovares mais prevalentes na região, além de incluir as de distribuição mundial. Este modo de proceder visa aumentar as chances de encontrar amostras sororreagentes (FAINE et al., 1999).

A técnica de SAM se baseia na visualização microscópica de uma reação de aglutinação entre o soro do animal testado e os antígenos vivos (sorovares) da coleção de referência do laboratório. Depois de um período de incubação, que promove a complexação antígeno-anticorpo, as soroaglutinações e os títulos para estas são determinados (LEVETT, 2001). A leitura é realizada num microscópio de campo escuro (WHO, 2003) e a titulação é dada pelo inverso da maior diluição onde foi possível visualizar pelo menos 50% de sorovares aglutinadas (LEVETT, 2001).

Se mais de uma sorovar aglutinar na presença do soro testado, prevalece aquela que apresentar os maiores títulos. No caso de duas sorovares diferentes, apresentarem as mesmas titulações, o resultado pode ter sido influenciado por reações cruzadas, não

sendo consideradas as sorovares aglutinantes, porém o diagnóstico genérico para a presença de anticorpos anti-leptospiras pode ser válido (FAINE et al., 1999).

Para a determinação do ponto de corte da SAM, precisam ser fornecidas as informações clínico-epidemiológicas dos animais e ambiente no qual estão expostos (WHO, 2003). Em geral, um título de 1:100 pode ser importante para um animal não vacinado com infecção aguda. Títulos de 1:200 ou 1:400, podem ser significativos para animais que apresentem aborto ou não, se estes forem vacinados e não tiverem nenhum indicativo de infecção crônica. (FAINE et al, 1999; WHO, 2003).

A realização de contraprova duas semanas após o aparecimento da sintomatologia pode ser uma ferramenta importante para indicar infecção aguda (LE FEBVRE, 2003). Títulos altos em bovinos costumam estar associado ao aborto provocado pelas sorovares acidentais (de outros hospedeiros). Títulos de 1:400 para uma sorovar acidental pode não ter importância, se não houverem sinais clínicos associados. Para exemplificar, uma vaca que abortou apresentando títulos de 1:100 para a sorovar hardjo (considerada natural em bovinos), pode pertencer a um rebanho onde a forma reprodutiva da leptospirose é importante (LEMOS e ALMEIDA, 2005).

Em cervídeos e bovinos, a sorovar pomona costuma apresentar títulos altos, comumente maiores que 1:800 (FOURNIER et al., 1986; LEMOS e ALMEIDA, 2005), mesmo sem sintomatologia aparente, isto se deve ao alto potencial patogênico que as hemotoxinas desta sorovar possuem para os ruminantes (FAINE et al., 1999).

2.3.6.2 Métodos Diretos

2.3.6.2.1 Isolamento bacteriano a partir do sangue

Principalmente nos períodos de bacteremia da leptospirose o isolamento bacteriano pode ser realizado como tentativa de prova diagnóstica. Tomando-se os devidos cuidados quanto à esterilidade das amostras, são colocadas de uma a cinco gotas de sangue em meios enriquecidos com albumina sérica ou soro de coelho (EMJH, Fletcher), próprios para o crescimento de leptospiras, sendo estes incubados em estufas de 28°C a 30°C por cerca de seis semanas (FAINE et al., 1999).

São então realizadas observações semanais para verificar se houve a formação do anel de crescimento subsuperficial (*Anel de Dinger*), caracterizado por uma zona turva, meio centímetro abaixo do menisco do meio (LEVETT, 2001; QUINN, 2005).

O crescimento é verificado através da microscopia de campo escuro (WHO, 2003). Havendo visualização de leptospiros pode ser necessária a identificação das sorovares, podendo ser feita sorologicamente, o que é bem limitado em função do número de laboratórios que realizam a técnica de absorção cruzada, ou através de tecnologias moleculares (SAVIO et al., 1994; REDSTONE e WOODWART, 1996; LEVETT, 2001).

2.3.6.2.2 Testes moleculares

A PCR é uma técnica molecular que consiste na detecção e amplificação do DNA, podendo ser utilizada para o diagnóstico em diferentes níveis taxonômicos de *Leptospira* sp. (REDSTONE e WOODWART, 1996; MASRI et al., 1997), de acordo com os iniciadores (*primers*) utilizados na reação.

Uma das vantagens descritas para a PCR é ser um método de diagnóstico aplicável a diferentes tipos de amostras (BRICKER, 2002a). Para as leptospiros, esta característica é providencial, já que outros tecidos e fluídos corporais que não o sangue podem ser utilizados (ÇETINKAYA et al., 2000; HEINEMANN et al., 2000). As leptospiros permanecem por curtos períodos no sangue, o que compromete os testes de diagnóstico direto (FAINE et al., 1999). Porém, a PCR mostrou-se muito sensível, detectando pequenas quantidades de DNA de *Leptospira* sp. até mesmo no sangue (MÉRIEN et al., 1992).

É possível no diagnóstico por PCR para as leptospiros, incluir *primers* para patógenos causadores de doenças correlatas que precisam ser consideradas no caso de negatividade para leptospirose. Desta forma, em uma mesma análise é obtido o diagnóstico preconizado e o diferencial para este (RICHTZENHAIN et al., 2002).

As regiões mais conservadas dos cromossomos das bactérias são as de eleição para a seleção e o desenho de *primers* funcionalmente sensíveis. O gene *rrs 16S* atende essa premissa, podendo identificar as leptospiros no nível de gênero (MÉRIEN et al., 1992). Os genes *omp* codificam as proteínas conservadas da membrana plasmática de diversas bactérias, sendo utilizado no diagnóstico das leptospiros para identificação das espécies patogênicas (CHEEMA et al., 2007).

Dentre os animais selvagens, foi testada a capacidade da PCR detectar leptospirosas presentes na urina ou nos rins de um macaco-prego (*Cebus apella*), utilizando *primers* desenhados para o gene *16S rRNA* e o isolamento microbiológico. Após 60 dias de incubação a 30 °C não houve crescimento de leptospirosas, porém a PCR foi capaz de detectar as bactérias, confirmando as lesões renais compatíveis (SCARCELLI et al., 2003)

Existem sequências genéticas polimórficas, com diferentes localizações num gene. Tais sequências, podem se repetir diversas vezes e em locais diferentes do DNA, caracterizando diferenças genotípicas. Desta maneira foi possível distinguir sorovares de leptospirosas através de elementos (sequências) genéticos (BAROCCHI et al., 2001)

2.3.7 Tratamento

Os bovinos podem ser tratados na fase aguda com estreptomicina e oxitetraciclina (FAINE et al., 1999). Para os cervídeos o protocolo de tratamento da leptospirose segue as seguintes orientações: a estreptomicina (doses de 12,5 mg/kg, 2 vezes/dia, 3 dias) ou a oxitetraciclina (10-15mg/kg – 2 vezes ao dia, por 3 dias), sendo este protocolo efetivo nos primeiros 7-10 dias de infecção (CORRÊA, 2007). Cervídeos jovens que sofrerem de anemia hemolítica podem receber transfusão sanguínea (MACKINTOSH et al., 2002).

2.3.8 Controle e vacinação

A imunização dos bovinos é necessária quando a ocorrência de surto de abortos ou de repetição de casos está associada à sorologia sugestiva de leptospirose. A profilaxia no rebanho pode seguir o seguinte esquema: uma vacinação em todo o rebanho no ano do surto; e outra periodicamente anual, somente nas matrizes, de 30 a 60 dias antes da estação de monta (PELLEGRIN e SILVA, 2002).

O controle da leptospirose nas populações selvagens pode ser feito indiretamente, através de medidas profiláticas aplicadas aos rebanhos domésticos que coabitam as mesmas áreas (MACKINTOSH et al., 2002), tais como: a vacinação com as bacterinas das sorovares específicas para a região; a adoção de medidas de manejo que minimizem a disseminação da doença, dentre elas, a proteção dos cursos de água e

a antibioticoterapia preventiva restrita aos grupos de risco. Pode ser realizado um monitoramento das populações selvagens por exames ou culturas de urina periódicas (MACKINTOSH et al., 2002; ANDERSON, 2007; CORRÊA, 2007).

3 REFERÊNCIAS

Adams L.G. 2002. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Veterinary Microbiology* 90 553-561.

Aguirre A.A., Hansena D.E., Starkeyb E.E., Mclean R.G. 1995. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*. 21:313-322.

Aguirre A.A., Starkey E.E. 1994. Wildlife disease in US national parks: historical and coevolutionary perspectives. *Conservation Biology*, *in press*.

Al Dahouk S., Nöckler K., Tomaso H., Splettstoesser W. D., Jungersen G., Riber U., Petry T., Hoffmann D., Scholz H. C., Hensel A. e Neubauer H. 2005. Seroprevalence of Brucellosis, Tularemia, and Yersiniosis in Wild Boars (*Sus scrofa*) from North-Eastern Germany. *Journal of Veterinary Medicine*, B 52, pp. 444–455.

Alonso-Andicoberry, C., Garcia-Pena, F.J., Pereira-Bueno, J., Costas, E., Ortega-Mora, L.M., 2001. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 52, 109–117.

Anderson M.L. 2007. Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. *Theriogenology*. 68:474–486.

Barocchi M.A., Ko A.I., Ferrer S.R., M.T. Faria, Reis M.O. e L.W. Riley 2001 Identification of New Repetitive Element in *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni and Its Application to PCR-Based Differentiation of *Leptospira* Serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 191–195.

Bengis R.G., Kock R.A. & Fischer J. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*. 21(1):53-65.

Benirschke K. 2005. Deer Species *Cervus*, *Odocoileus*, etc. In: Comparative Placentation, Benirschke K. International Veterinary Information Service, Ithaca NY. 14p.

Bevins J., Blake J.E., Adams L.G., Templeton J.W., Morton J.K. e Davis D. 1996. The pathogenicity of *Brucella suis* biovar 4 for bison, Journal of Wildlife Diseases Wildlife Disease Association 32 (4), pp. 581-585.

Boschiroli, M. L., S. Ouahrani-Bettache, V. Foulongne, S. Michaux-Charachon, G. Bourg, A. Allardet-Servent, C. Cazevielle, J. P. Liautard, M. Ramuz, and D. O'Callaghan. 2002. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 99:1544–1549.

Brasil 1998. Guia de Vigilância Epidemiológica Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. 523p.

Brasil 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 192p.

Brasil. 2003. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 130p.

Bricker B., Ewalt D., Olsen S. e Jensen A. 2003. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, na improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. Journal Veterinary Diagnostic Investigation 15:374–378.

Bricker B.J. 2002b. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. Veterinary Microbiology 90 (2002) 433-434

Bricker B.J., Halling S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv.1 by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 32: 2660-2666, 1994.

Bricker, B.J., 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Veterinary Microbiology 90, 435-446.

Bricker, B.J., Halling, S.M., 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. Journal of Clinical Microbiology. 33, 1640–1642.

Catão-Dias J.L. & Carvalho V.M. 2007. Tuberculose. *In: Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária*. 1ª ed. Roca, São Paulo, p.726-735.

Çetinkaya B H., Ertas B., Öngör H., Muz A. 2000. Detection of leptospira species by polymerase chain reaction (pcr) in urine of cattle. *Turkey Journal of Veterinary Animal Science* 24 123–130.

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, J.S.; Ferreira Neto, J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61 (1): 46-55.

Cheema P.S., Srivastava S.K., Amutha R., Singh H. e Sandey M. 2007. Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. *Indian Journal of Experimental Biology* 45: 568-573.

Cheville N. F. e McCullough D. R. 1998. *Brucellosis in the Greater Yellowstone Area*, National Research Council, Washington DC, 207p.

Cook, W. E., Williams E., Thorne E., Kreeger T., Stout G., Bardsley K., Edwards H., Schurig G., Colby L., Eenright F., e Elzer P. 2002. *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in elk I. Efficacy of reduced dosage. *Journal of Wildlife Diseases* 38:18–26.

Corbel M.J 2006. *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health, 102p.

Corrêa S.H.R. 2007. Leptospirose. *In: Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária*. 1ª ed. Roca, São Paulo, p.736-741.

Costa M. 2001. Brucelose Bovina e Equina *In: Doenças de Ruminantes e Equinos*. 2ª ed. Varela, São Paulo, v.1 p. 187-197.

Daszak P, Cunningham AA, & Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 288:2319-2320.

Davis D.S. e Elzer P.H. 2002. *Brucella* vaccines in the wildlife. *Veterinary Microbiology* 90 (2002) 533-544.

Delrue R., Lestrade P., Tibor A., Letesson J.J., De Bolle X. 2004. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS. Microbiology Letters* 231 1-12.

Demaría M.R., McShea W. J., Koy K., Maceira N.O. 2003. Pampas deer conservation with respect to habitat loss and protected area considerations in San Luis, Argentina. *Biological Conservation* 115 pp121–130.

Dieterich RA. 1981. Brucellosis. *In*: Dieterich RA, ed. *Alaskan Wildlife Diseases*. Fairbanks, Alaska: Institute of Arctic Biology 53-58.

Duarte J.M.B. & Merino M.L. 1997. Taxonomia e evolução. *In*: *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. 1ªed. Funep, Jaboticabal, p.1-22.

Duarte J.M.B. 2007. Artiodactyla – Cervidae (Veado-catingueiro, Veado-campeiro, Cervo-do-pantanal). *In*: *Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária*. 1ª ed. Roca, São Paulo, p.641-664.

Ebani V. V., Cerri D., Poli A., e Andreani E. 2003. Prevalence of leptospira and brucella antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy 2003. *Journal of Wildlife Diseases, Wildlife Disease Association*, 39(3), p.718–722.

Elisei C., Pellegrin A., Tomas W.M., Soares C.O., Araújo F.R., Funes-Huacca M.E., Rosinha G.M.S. 2010. Evidência molecular de *Brucella* sp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(6):503-509.

Essenberg R., Seshadri R., Nelson K. Paulsen I. 2002. Sugar metabolism by *Brucellae*. *Veterinary Microbiology* 90 249-261.

Ewalt D.R, Bricker B.J. 2000 Validation of the Abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a RapidScreening Method for Differentiation of *Brucella abortus* FieldStrain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*. (38) p.3085–3086.

Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Martin, B.M., Cummins, D.R., Miller, W.G., 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 448–452.

Faine, S., Adler, B, Bolin, C.A., Perolat, P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. *Medicine and Science*. Melbourne, 296p.

Forbes L. 1991. Isolates of *Brucella suis* biovar 4 from animals and humans in Canada, 1982-1990 *Canadian Veterinary Journal* 32: 686-688.

Foster, G., MacMillan, A.P., Godfroid, J., Howie, F., Ross, H.M., Cloeckaert, A., Reid, R.J., Brew, S., Patterson, I.A.P., 2002. A review of *Brucella* sp. infection of seamammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Veterinary Microbiology*. 90, 563–580.

Fournier, J. S., Gordon J. C. e Dorn R. 1986. Comparison of antibodies to *Leptospira* in whitetailed deer (*Odocoileus virginianus*) and cattle in Ohio. *Journal of Wildlife Diseases* 22: 355–339.

Gall D., Nielsen, K., Forbes L., Cook W., Leclair D., Balsevicius S., Kelly L., Smith P. e Mallory M. 2001. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *Journal of Wildlife Diseases, Wildlife Disease Association* 37(1), pp. 110–118.

Girio R.J.S., Pereira F.L.G., Marchiori Filho M., Mathias L.A., Herreira R. de C.P., Alessi A.C., Girio T.M.S. 2004. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres ou em estado feral da região da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. *Ciência Rural*. 34(1):165-169.

Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*. 21(1):277-286.

Godfroid J. e Käsbohrer A, 2002. Brucelose in the European Union and Norway at the twenty-first century. *Veterinary Microbiology* 90 (2000) 135-145.

Gomes M.J.P., 2009. Gênero *Brucella* spp. Apostila da Disciplina de Microbiologia Clínica Veterinária FAVET-UFRGS, 50p.

González S., Cosse M., Braga F.G., Vila A.R., Merino M.L., Dellafiore C., Cartes J.L., Maffey L., Dixon M.G. 2010a Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus 1758. In: *Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer FUNEP/IUCN* São Paulo, p. 119-132.

González S., Duarte J.M.B e Maldonado J.E. 2010b. Molecular phylogenetics and evolution. *Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer FUNEP/IUCN*, São Paulo, p. 12-17.

Gorvel J., Moreno E. 2002 *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology* 90 281-297

Hartigh A., Rolán H., Jong M. e Tsolis R. 2008. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but Not VirB7 are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *Journal of Bacteriology*, p.4427–4436 Vol. 190, No. 13.

Hartigh, A. B.; Sun, Y.; Sondervan, D.; Heuvelmans, N.; Reinders, M. O.; Ficht, T. A.; Tsolis, R. M. 2004. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*. V.72:5143-5149.

Heinemann, M.B., Garcia, J.F., Nunes, C.M., Gregori, F., Higa, Z.M.M., Vasconcellos, S.A., Richtzenhain, L.J., 2000. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology* 73, 261–267.

Herbreteau, Gonzalez J.P., Andrianasolo H., Kittayapong P. e J.P. Hugot 2005. Mapping the Potential Distribution of *Bandicota indica*, Vector of Zoonoses in Thailand, by Use of Remote Sensing and Geographic Information Systems (a Case of Nakhon Pathom Province). *The Natural History Journal of Chulalongkorn University* 5(2): 61-67.

Ito F.H., Vasconcellos S.A., Bernardi F., Nascimento A.A., Labruna M.B., Arantes I.G. 1998. Evidência sorológica de brucelose e leptospirose e parasitismo por Ixodídeos em animais silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Ars Veterinária* 14 (3): 302-310.

Köhler S. Porte F., Jubier-Maurin V., Ouahrani-Bettache S., Teyssie J., Liautard J.P. 2002. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Veterinary Microbiology* 90 299-309.

Kreeger T., Cook W., Edwards W., Elzer P. e Olsen S. 2002. *Brucella abortus* strain rb51 vaccination in elk ii. Failure of high dosage to prevent abortion. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), pp. 27–31

Lacerda A.C.R. 2008 Ecologia e estrutura social do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal [tese] Brasília (DF): UnB, Tese de Doutorado; 194p.

Lage A. P., Poester F. P., Paixão T. A., Silva T. M. A., Xavier M. N., Minharro S., Miranda K. L., Alves C. M., Mol J. P. S., Santos R. L. 2008. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212.

Le Febvre R.B. 2003. Leptospiras. *In: Microbiologia Veterinária*, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 174-178.

Lemos R.A.A. e Almeida A.P.M.G. 2005. Leptospirose bovina. *In: Leptospirose bovina, Campilobacteriose genital bovina, Tricomonose bovina e Neosporose em bovinos*, Ed. UFMS pp. 9-35.

Levett P. N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(2):296–326.

Lilenbaum W. e Souza G.N. 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science*. 75: 249-251

Lilenbaum W., Monteiro R.V., Ristow P., Fraguas S., Cardoso V.S., Fedullo L.P.L. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Research in Veterinary Science*. 73:319–321.

Lucero, N. E., Ayala, S. M., Escobar, G. I., Jacob, N. R. 2008. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection*, v. 136, p. 496-503.

Mackintosh C., Haigh J.C., Griffin F. 2002. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*. 21(2):249-263.

Masri, S.A., Nguyen, P.T., Gale, P., Howard, C.J., Jung, S.C., 1997. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 61, 15–20.

Mathias L.A., Girio R.J.S. & Duarte J.M.B. 1999. Serosurvey For Antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 35(1):112-114.

Mayer-Scholl, A. Draeger A., Göllner, C. Scholz H. C., Nöckler K. 2010. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of Microbiological Methods* 80 112–114.

Mérien F., Amouriaux P., Perolat P. et al. 1992. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. p.2219-2224.

Merino M.L., Gonzales S., Leeuwenberg F. 1997. Veado Campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) *In: Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. 1ªed. Funep, Jaboticabal, p. 42-58.

Mineiro A.L.B.B., Bezerra E.E.A., Vasconcellos S.A., Costa F.A.L., Macedo N.A. 2007. Infecção por *Leptospira* em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.59, n.5, p.1103-1109.

Minharro S., Mol J.P.S., Pauletti R.B., Dorneles E..S., Poester F.P., Dasso M.G., Scarcelli E., Filho P.M.S., Heinemann M.B., Santos R.M, LAGE A.P. 2009. Biovariedades de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil, Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1– Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.

Miyashiro S., Scarcelli E., Piatti R., Campos F., Vialta A., Keid L., Dias R., Genovez M. 2007 Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR). Brazilian Journal of Microbiology 38:17-22.

Monteiro L.A.R.C., Pellegrin A.O., Ishikawa M.M., Osório A.L.A.R. 2006. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira 26(4):217-222.

Moreno, E., Cloeckert, A., Moriyon, I., 2002. Brucella evolution and taxonomy. Veterinary Microbiology 90, 209–227.

Mörner T., Obendorf D.L. Artois M. Woodford M. H. 2002. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties. 21 (1), 67-76.

Nielsen K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. Veterinary Microbiology 90: 447-459.

Nielsen K., Lin M., Gall D., e Jolley M. 2000. Fluorescence Polarization Immunoassay: Detection of Antibody to *Brucella abortus*. Methods 22, 71-76

Ocampo-Sosa, A.A., Aguüero-Balbín, J., García-Lobo, J.M., 2005. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. Veterinary Microbiology. 110, 41–51.

OMS. 1986. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Serie de Informes Técnicos. 740:149.

Osório A.L.A.R. e Monteiro. L.A.R.C. 2006. Brucelose bovina. In: Brucelose bovina, tuberculose bovina. Campo Grande, MS, UFMS p. 9-57.

Paulin L.M. & Ferreira Neto J.S. 2003. O Combate à Brucelose Bovina: situação brasileira. 1ª ed. Funep, Jaboticabal, SP. 154p.

Paulin L.M. 2003. Brucelose. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.70, n.2, p.239-249.

Pellegrin A.O. e Silva R.A.M.S. 2002 Saúde. *In*: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) pp 46-47

Pellegrin A.O., Guimarães P.H.S., Sereno J.R.B., Figueiredo J.P., Lage A.P., Moreira E.C., Leite R.C. 1999. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. Comunicado Técnico 22, Embrapa Pantanal, Corumbá, 9p.

Pessegueiro P., Barata C. e Correia J. 2003. Brucelose – uma revisão sistematizada. Medicina Interna Vol. 10, N. 2.

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. 2009. 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, v.61, supl. 1, p.1-5.

Queipo-Ortuño, M.B., Morata, P., Oco'n, P., Manchado, P., Dios Colmenero, D., 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. Journal of Clinical Microbiology 35, 2927–2930.

Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Deonnelly W.J., Leonard F.C. 2005. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Editora Art Med, Porto Alegre. 512p.

Ragan V.E. 2002. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the Unites States. Veterinary Microbiology 90 (2002) 11-18.

Redstone, J. S., and M. J. Woodward. 1996. The development of a ligase mediated PCR with potential for differentiation of serovars within *Leptospira interrogans*. Veterinary Microbiology 51:351–362.

Ribeiro M., Motta R. e Almeida C. 2008 Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.83-92.

Richtzenhain L., Cortez A., Heinemann M., Soares R., Sakamoto S., Vasconcellos S., Z. Higa, E. Scarcelli, M. Genovez. 2002 A multiplex PCR for the detection of *Brucella*

spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Veterinary Microbiology* 87:139–147.

Ridler A. 2001. *Brucella ovis* infection in deer. *Surveillance*. 28(3) pp. 06-08.

Romero, C., Gamazo C., M. Pardo, and I. Lopez-Goni. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33:615–617.

Rouot, B., M.T. Alvarez-Martinez, C. Marius, P. Mentanteau, L. Guilloteau, R.A. Boigegrain, R. Zumbihl, D. O'Callaghan, N. Domke, and C. Baron. 2003. Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infection and Immunity*. 71:1075–1082.

Santos S.A. 2002. Aspectos Agro e Zoológicos. *In: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal*, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) pp 14-17.

Savio, M. L., C. Rossi, P. Fusi, S. Tagliabue, e M. L. Pacciarini. 1994. Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 32:935–941.

Scarcelli E., Piatti R.P., Fedullo J.D.L., Simon F., Cardoso M.V., Castro V., Miyashiro S.; Genovez M.E. 2003. *Leptospira* spp. detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (*Cebus apella*) Brazilian *Journal of Microbiology* 34:143-146.

Scholz, H.C., Hofer, E., Vergnaud, G., Fleche, P.L., Whatmore, A.M., Dahouk, S.A., Pfeffer, M., Krüger, M., Cloeckert, A., Tomaso, H., 2009. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in Lower Austria. *Vector - Borne and Zoonotic Diseases*. 9, 153–155.

Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, Nöckler H.J.K., 2008a. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 375–382.

Scholz, H.C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., De, B.K. 2009. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *in press*.

Schurig G., Sriranganathan N., Corbel M.J. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.479-496.

Seleem M.N., Boyle S.M., Sriranganathan N. 2010 Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology* 140 (2010) 392–398.

Steele J.H. 1959. La epidemiologia de la leptospirosis en Estados Unidos, con referencia especial a los animales silvestres como reservorios. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. Centro de Enfermedades Transmisibles, Atlanta, Estados Unidos 299-305.

Stoenner, H.G., Lackman, D.B., 1957. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *American Journal Veterinary Research* 18, 947–951.

Tessaro S.V., Forbes L.B., Turcotte C. 1990. A survey of brucellosis and tuberculosis in bison in and around Wood Buffalo National Park, Canada. *The Canadian Veterinary Journal* 31(3) p.174-180.

Tiepolo L.M. & Tomas W.M. 2006. *Ordem Artiodactyla. Mamíferos do Brasil*. Sema, Londrina, p.268-288.

Uhart M., Mangione P., Gauvez C., Corti P., Milano F., Jorge M., Girio R., Mathias L., Schettino A., Catena M., Terragno R. e Aprile G. 2010. Bacterial Diseases. *In: Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer*. FUNEP/IUCN São Paulo pp.342-362.

USDA 2003. Brucellosis in Cervidae: Uniform Methods and Rules. United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service APHIS. Department of Agriculture, 23p.

USDA 2008. Evaluation of the brucellosis and bovine tuberculosis status of bison and elk in Elk Island National Park, Canada. *Veterinary Services Animal and Plant Health Inspection Service United States*. Department of Agriculture. 63 p.

Vanasco N.B., Lottersberger J., Sequeira M.D., Tarabla H. 2002. Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. *Veterinary Microbiology* 82 321-330.

Vemulapalli R., McQuiston J., G. Schurig, Sriranganathan N., Halling S., e Boylei. S., 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other

Brucella species and strains. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 6, 760–764.

Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Grayon, M., 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. International Journal of Systematic Bacteriology. 35, 292–295.

Vieira A.S. 2009. Levantamento de *Leptospira* spp em animais silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares [dissertação] Campo Grande (MS): UFMS, Mestrado; 83p.

Villas-Boas J.C., Olegário L.A.O., Tomas W.M., Lacerda A.C.R., Lima-Borges P.A., Pellegrin A.O., Tomishi R.G.P., Madruga C.R., Kessler R.H., Araújo F.R., Rosinha G. 2007. Survey of *Babesia bovis* and *bigemina* in *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* deer in the Pantanal wetland, Nhecolândia, Brazil. Parasitologia. Resumo 49(1):109.

Walker, R.L. 2003. *Brucella*. In: Microbiologia Veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 185-191.

Watari M., Ito N., Omata Y, Ishiguro, N. 2006. A serological survey of *Brucella* spp. in free ranging wild boar (*Sus scrofa maucomystax*) in Shikoku, Japan. Journal of Veterinary Medicine and Science. 68 (10): 1139-1141.

Whatmore, A. M. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infection, Genetics and Evolution 9 (2009) 1168–1184.

Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., Nöckler, K., 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. International Journal of Systematic and Evolution Microbiology. 58, 375–382.

WHO 2003 Human leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and control. World Health Organization 122 p.

Witter J.F. 1981. Brucellosis. Infectious diseases of wild mammals. 2nd ed. Iowa State Pr, Iowa, p.280-287.

Wobeser G. 2002. Disease management strategies for wildlife. Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties. 21(1):159-178.

Wobeser, G. A. 2006. Essentials of Disease in Wild Animals. Blackwell Publishing, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 243p.

OCORRÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DA BRUCELOSE COM AS TAXAS DE FÊMEAS DE VEADO-CAMPEIRO (*OZOTOCEROS BEZOARTICUS*) ENCONTRADAS SEM FILHOTES NA NHECOLÂNDIA, CORUMBÁ, MS

Igor Alexandre H. F. Schabib-Péres^{1,3}, e Aiesca O. Pellegrin²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Av. Senador Filinto Müller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-342, Brasil.

² Embrapa Pantanal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, R. 21 de Setembro, 1880, Corumbá, MS, Caixa Postal 109, 790320-900, Brasil.

³ Autor para correspondência (e-mail: igorale_vet@hotmail.com).

ABSTRACT: The *Brucella* sp. infections happen in several domestic species, savages and in the man. The brucellosis provokes mainly reproductive losses that can commit the survival of wild species. The pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*) is in intimate contact with bovine infected by *Brucella* sp. in the Pantanal, possessing biological habits similar to the domestic ruminants, what can facilitate the interspecific circulation of infectious diseases. The objectives of this study were determine the prevalences by serologic and molecular diagnosis for *Brucella* sp. in pampas deer populations that live together with bovine in the sampled area and to verify which are the variables associated with the occurrence of females of these cervids without nestlings in the station of the births. In the Southwest of Nhecolândia, municipal district of Corumbá, MS, 56 females and three males os pampas-deer were captured and identified for the collection of samples of total blood and serum for the molecular and serologic diagnosis of the brucellosis. In all the females ultrasound scan was accomplished for evaluation of the gestation, tends as result 98,21% (55/56) of pregnancy. The assertiveness taxes found to the *Brucella* sp. were of 10,17% (6/59) for the proof of the buffered antigen plate agglutination test (BPAT), 3,39% (2/59) for the test of the 2 mercaptoethanol (2ME) and 11,86% (7/59) for the polimerase chain reaction (PCR) with the primers *IS711 AF* and *IS711 CR*. There was significant association among the positive diagnoses for brucellosis for AAT and for PCR *IS711* (*odds ratio* = 12,2500), giving larger reliability to the found results. The brucellosis was not significantly associated to the females of pampas-deer found without their nestlings in the birth station, situation that was related with the reproductive age of these females whose which were primipares (*odds ratio* = 12,3077).

Key words: *Ozotoceros bezoarticus*, *Brucella* sp., occurrence, serumdiagnosis, PCR *IS711*, reproductive impact.

RESUMO: As infecções por *Brucella* sp. ocorrem em diversas espécies domésticas, selvagens e no homem. A brucelose provoca principalmente perdas reprodutivas que podem comprometer a sobrevivência de espécies selvagens. O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) está em íntimo contato com bovinos infectados por *Brucella* sp. no Pantanal, e possui hábitos biológicos comuns aos ruminantes domésticos, o que pode facilitar a circulação interespecífica de doenças infecciosas. Neste estudo teve-se como objetivos determinar as prevalências sorológicas e moleculares para *Brucella* sp. nas populações de veado-campeiro que convivem com bovinos na área amostrada e verificar quais são as variáveis associadas com a ocorrência de fêmeas destes cervídeos desacompanhadas de filhotes na estação dos nascimentos. No sudoeste da Nhecolândia, município de Corumbá, MS, foram capturadas e identificadas 56 fêmeas e três machos de veado-campeiro para a coleta de amostras de sangue total e soro para o diagnóstico molecular e sorológico da brucelose. Em todas as fêmeas foi realizada ultra-sonografia para avaliação da gestação, tendo como resultado 98,21% (55/56) de prenhez. Foram encontradas taxas de positividade à *Brucella* sp. de 10,17% (6/59) pela prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), 3,39% (2/59) pelo teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) e de 11,86% (7/59) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* *IS711 AF* e *IS711 CR*. Houve associação significativa entre os diagnósticos positivos para brucelose pelo AAT e pela PCR *IS711* (*odds ratio* = 12,2500), dando maior confiabilidade aos resultados encontrados. A brucelose não foi significativamente associada às fêmeas de veado-campeiro encontradas sem os seus filhotes na estação de nascimento, situação que esteve relacionada com a idade reprodutiva destas fêmeas que eram primíparas (*odds ratio* = 12,3077).

Palavras-chave: *Ozotoceros bezoarticus*, *Brucella* sp., ocorrência, sorodiagnóstico, PCR *IS711*, impacto reprodutivo.

INTRODUÇÃO

A necessidade humana de modificar a natureza pode desequilibrar as interações entre os patógenos, hospedeiros e ambiente. Os interessados no uso do ambiente para a produção de alimentos de maneira sustentável devem considerar as interfaces zôo-sanitárias bidirecionalmente, pois doenças restritas ao meio selvagem podem ser potencialmente infectantes para os animais domésticos causando prejuízos sócio-

econômicos, e por outro lado, os patógenos dos animais de produção podem causar risco potencial na conservação da fauna susceptível (Bengis et al., 2002).

No Pantanal a pecuária de corte é uma das principais atividades econômicas sendo desenvolvida em pastagens naturais, através do sistema de produção extensivo (Abreu, 2002; Santos, 2002), onde o gado utiliza as mesmas áreas pouco modificadas, que os animais selvagens nativos (Lacerda, 2008).

O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) é um cervídeo, ruminante selvagem com características biológicas semelhantes aos bovinos, utilizando os mesmos campos para se alimentar, agregando-se muitas vezes ao gado e sendo afetado por doenças em comum (Duarte e Merino, 1997; Tiepolo e Tomas, 2006; Duarte, 2007; Lacerda, 2008).

É importante manter a vigilância e o monitoramento das doenças que possam atingir vários grupos taxonômicos, especialmente nas áreas onde os sistemas de produção estão em estrito contato com a natureza (Mörner et al., 2002) e os animais domésticos e selvagens em simpatria.

A brucelose, é causada por diversas espécies do gênero *Brucella* sp., ocorrendo no ser humano e nos animais domésticos e selvagens. Sua ocorrência no homem possui um caráter ocupacional (Walker, 2003) e depende da existência de reservatórios animais, incluindo os de vida livre (Godfroi, 2002). O leite e seus derivados constituem a principal fonte de infecção para as pessoas (Corbel, 2006). Nos bovinos e cervídeos a transmissão mais comum é pela ingestão de água ou pastagens contaminadas com secreções e tecidos, principalmente placenta, infectados por *Brucella* sp. (BRASIL, 2006; Uhart et al., 2010). O contato com a mucosa nasal ou conjuntival, a transmissão congênita e a mamária também são importantes para os ruminantes (Paulim, 2003; BRASIL, 2006). No caso de infecção por *B. ovis* a transmissão venérea é comum nos cervídeos (Ridler, 2001; Uhart et al., 2010).

A ocorrência do aborto no terço final da gestação é o sintoma clássico da infecção por *B. abortus* tanto nos bovinos, como nos ruminantes selvagens (Kreeger et al., 2002; Anderson, 2007). Sintomas típicos como a repetição do cio, a retenção da placenta, descargas uterinas e o nascimento de crias fracas foram reportados em bisões e cervídeos com *Brucella* sp. (Kreeger et al., 2002; Mackintosh et al., 2002; USDA, 2008). A placentite necrosante é a principal lesão macroscópica encontrada na brucelose dos ruminantes (Paulin, 2003). Nos machos de várias espécies de cervídeos existem relatos de sub-fertilidade, orquite, epididimite e inflamação das glândulas anexas

sexuais nas infecções por *B. abortus* e *B. ovis* (OMS, 1986; Ridler, 2001; Mackintosh et al., 2002; Uhart et al., 2010).

Para que um programa de controle sanitário reduza as perdas para animais selvagens e domésticos, são necessários dados sobre o agente etiológico, a susceptibilidade dos hospedeiros e a biologia das espécies envolvidas, elucidando as vias epidemiológicas que possibilitam a disseminação da doença (Wobeser, 2002; Godfroid, 2002; Wobeser, 2006).

Este estudo teve como objetivos: determinar as prevalências sorológicas e moleculares para *Brucella* sp. nas populações de veado-campeiro que convivem com bovinos na área amostrada e verificar quais são as variáveis associadas com a ocorrência de fêmeas destes cervídeos desacompanhadas de filhotes na estação dos nascimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Período e local do estudo

As capturas, identificação dos animais, coletas de amostras biológicas e o diagnóstico de gestação foram realizados no mês de julho de 2009, sendo os animais monitorados quanto às parições e a sobrevivência dos adultos e filhotes nascidos até junho de 2010.

Todo o estudo foi executado em área localizada na sub-região pantaneira da Nhecolândia, município de Corumbá-MS, Brasil, com aproximadamente 20.000 ha de extensão e contemplando três propriedades rurais de criação extensiva de gado de corte.

As coordenadas geográficas dos locais das capturas foram obtidas por aparelho de geo-referenciamento e anotadas juntamente com a descrição fitofisionômica circundante para orientar o posterior monitoramento dos animais.

Contenção dos animais e tratamento das amostras

Cinquenta e seis fêmeas e três machos de veado-campeiro foram capturados utilizando-se uma pistola de propulsão pneumática (Modelo 35, Distinfect[®], Basel, Suíça) para dardos tranqüilizantes que continham uma preparação anestésica conforme a Tabela 1.

TABELA 1. Doses dos fármacos utilizados nos dardos anestésicos para a contenção química em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) adultos e subadultos.

Peso Estimado	Fármaco	Apresentação	Dose/Kg	Dose/animal	Volume/dardo
30 kg (animal adulto)	Tiletamina-Zolazepam	50 mg/ml	2,5 mg	75,0 mg	1,5 ml
	Xilazina	20 mg/ml	1 mg	30 mg	1,5 ml
	Atropina	10 mg/ml	0,05 mg	1,5 mg	0,15 ml
20 kg (animal subadulto)	Tiletamina-Zolazepam	50 mg/ml	1,84 mg	33,33 mg	0,73 ml
	Xilazina	20 mg/ml	1,11 mg	22,2 mg	1,11 ml
	Atropina	10 mg/ml	0,06 mg	1,2 mg	0,12 ml

Após o término dos procedimentos no animal, revertia-se o efeito da xilazina com a aplicação da ioimbina (Tabela 2). Durante a anestesia todos os cervídeos tiveram sua temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória e reflexos monitorados a cada 15 minutos, sendo inspecionados clinicamente e identificados com coleiras e brincos numerados.

TABELA 2. Doses da ioimbina utilizada como reversora da xilazina em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) adultos e subadultos.

Fármaco	Peso Estimado	Apresentação	Dose/Kg	Dose/animal	Volume/dardo
Ioimbina	30 Kg	3 mg/ml	0,2 mg	6 mg	2 ml
	20 Kg	3 mg/ml	0,2 mg	4 mg	1,33 ml

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção em frascos com e sem EDTA sódico, respectivamente, para obtenção do sangue não coagulado e do soro sanguíneo. O material foi mantido a -4 °C em isopor com bolsas de gelo até o término de cada dia de trabalho, sendo então aliquotado e armazenado em *freezer* a -20 °C no laboratório da Fazenda Nhumirim.

Este projeto teve aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que permitiu a anestesia e coleta de material biológico desta espécie selvagem sob o N° de autorização: 20029-1 / código de autenticação: 69745473.

Diagnóstico de gestação

Todas as fêmeas de veado-campeiro foram submetidas ao diagnóstico de prenhez por palpação abdominal direta, auscultação dos batimentos cardíacos fetais e ultra-sonografia transabdominal com sonda transdutora linear e o aparelho de ultra-som (CTS-385V, Shantou Institute of Ultrasonc Instruments [SIUI] Inc., Hong Kong, China) multifrequencial, com variações entre 5 e 7,5 Mhz de frequência permitindo a visualização do feto. O diagnóstico positivo da prenhez era dado quando eram visualizados os batimentos cardíacos fetais (BCF), os placentomas e outras estruturas do feto. Na estação de parição de 2009 (agosto-outubro), as fêmeas identificadas de veado-campeiro, quando encontradas, foram monitoradas até o nascimento de suas crias para a constatação do sucesso reprodutivo.

Diagnóstico sorológico

No Laboratório de Doenças Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, o soro dos veados-campeiros foi examinado quanto à presença de anticorpos para a brucelose pelo teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e pelo teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol (2-ME). Estes testes de diagnóstico são reconhecidos como oficiais pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) (Brasil, 2006).

Diagnóstico molecular

A partir das amostras de sangue total dos veados-campeiros foi extraído o DNA genômico (Araújo et al. 2009) no Laboratório de Biologia Molecular Animal da Embrapa Gado de Corte (CNPGC), Campo Grande-MS.

Para o diagnóstico do gênero *Brucella* sp. pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizou-se os *primers* *IS711AF* (5' TTAAGCGCTGATGCCATTTCCTTCAC 3') e *IS711CR* (5' GCCAACCAACCCAAATGCTCACAA 3') que amplificam produtos de aproximadamente ($\approx$) 400 pares de bases (pb) para todas as espécies e cepas de *Brucella* sp., exceto *B. abortus* RB51 que possui um produto de $\approx$ 1300 pb amplificados na utilização destes *primers* (Vemulapalli et al., 1999).

As amostras de DNA para controle positivo de *Brucella abortus* 2308 e *B. abortus* RB51 foram obtidas no banco de referência da Embrapa Gado de Corte e Embrapa Pantanal.

A solução da PCR *IS711 AF/CR* foi preparada em microtubos de 200 µl tendo: 2,0 µl de Tampão PCR 10X; 0,6 µl de MgCl₂ (1,5 mM); 0,6 µl de nucleotídeos (dNTP's, numa concentração de 250 µM); 1,0 µl de cada *primer* (5 pmoles); 0,3 µl de *TaqDNA*-polimerase (1,0 UI); 1,0 µl do DNA (100 ηg/µl) a ser testado; e H₂O (*Mili-Q*[®]) em quantidade suficiente para (q.s.p.) completar 20 µl de volume final.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler Gradient[®]), onde a desnaturação inicial foi realizada a 95 °C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C / 60 segundos, anelamento a 60,5 °C / 60 segundos, extensão a 72 °C / 90 segundos e uma extensão final a 72 °C / 10 minutos, para a adenilação da sequência formada.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese de 80 a 100 V por 1 a 2 horas em gel de agarose em concentrações de 0,8 a 1,5 %. O gel foi corado com SYBR GOLD (Invitrogen[®]) e visualizado pelo aparelho transluminador (Lpix HE, Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta, sendo as bandas fotodocumentadas.

Delineamento e tratamento dos dados

O estado de animal portador para a *Brucella* sp. foi identificado com base nos resultados positivos pela PCR, considerou-se também presuntivamente como animais portadores os positivos na sorologia. As unidades amostrais consideradas foram os cervídeos que eram positivos ou negativos para os testes diagnósticos empregados. Este trabalho teve um tratamento observacional (descritivo), onde não houve a interferência do pesquisador nos dados coletados.

Foram utilizados dois tipos de delineamento:

- o levantamento das fêmeas gestantes de veado-campeiro e das prevalências sorológicas e moleculares da brucelose na população estudada;
- o estudo das variáveis associadas ao diagnóstico positivo da brucelose nos cervídeos e relacionadas ao impacto reprodutivo, constatado pela observação de fêmeas acompanhadas ou não de seus filhotes na estação de parição.

Considerando-se que o projeto tem como foco principal às populações selvagens, estabeleceu-se uma amostragem mínima baseada em levantamentos realizados anteriormente, na prevalência estimada para as doenças (50%), num erro aceitável de 10% (95% de confiança) e na capacidade operacional da equipe.

A prevalência amostral (*Pa*) para a brucelose em veado-campeiro foi calculada pela fórmula **$Pa = n/N \times 100$** , onde:

n = número de cervídeos positivos na amostra

N = número total de cervídeos amostrados.

Os resultados das fichas de campo e dos testes de diagnóstico foram armazenados em planilhas computacionais (Microsoft Excel® 2007), sendo posteriormente associados aos fatores de risco em tabelas de contingência do tipo 2 x 2 para as estimativas de *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%. O Teste do Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher foram empregados nas associações significativas de OR com $p < 0,1$ ou $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do pacote computacional BioEstat 4.0 (Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 2006, Belém/PA, Brasil).

RESULTADOS

Em seis (10,17%) dos 59 veados-campeiros houve soroaglutinação contra *Brucella* sp. no teste de triagem do AAT e em dois destes animais o diagnóstico foi confirmado pela prova do 2-ME, indicando uma soroprevalência para brucelose de 3,39% (2/59). Os animais positivos apresentaram reações incompletas na prova do 2-ME, uma reação ocorreu na diluição de 1:50 e a outra na diluição de 1:25 (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado dos testes de sorodiagnóstico para *Brucella* sp. em uma população de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) da região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul.

Nº Identificação	AAT ¹	2-ME ²	Resultado da sorologia
005	Positivo	Negativo	Negativo
059	Positivo	Negativo	Negativo
070	Positivo	25 I	Positivo ³
083	Positivo	Negativo	Negativo
086	Positivo	Negativo	Negativo
114	Positivo	50 I	Positivo

AAT = Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (rosa-bengala)

² 2-ME = Teste do 2-Mercaptoetanol, com resultados expressos em titulações de 25, 50, 100 ou 200 seguidas da letra “I” para reação de aglutinação incompleta e “C” para reação completa.

³ A aglutinação na diluição de 1:25 incompleta não é considerada positiva para bovinos pelo PNCEBT, porém para cervídeos o resultado foi tido como positivo a ser confirmado pelo diagnóstico molecular.

Utilizando-se os *primers* IS711AF e IS711CR na PCR, foi possível detectar DNA de *Brucella* sp. no sangue de sete (11,86%) veados-campeiros. Todas as bandas visualizadas apresentaram um produto de aproximadamente 400 pb, exceto o controle positivo para a cepa vacinal de *Brucella abortus* RB51, que teve uma banda amplificada de aproximadamente 1300 pb (Fig. 1).

Os animais de número 059 e 083, que haviam sido positivos pelo teste do AAT e não pelo 2-ME, tiveram amplificadas bandas de aproximadamente 400 pb características de *Brucella* sp. na PCR *IS711*. O cervídeo de número 070, que havia apresentado aglutinação incompleta na diluição de 1:25 do teste do 2-ME, foi confirmado como positivo pela PCR *IS711* (Fig. 1).

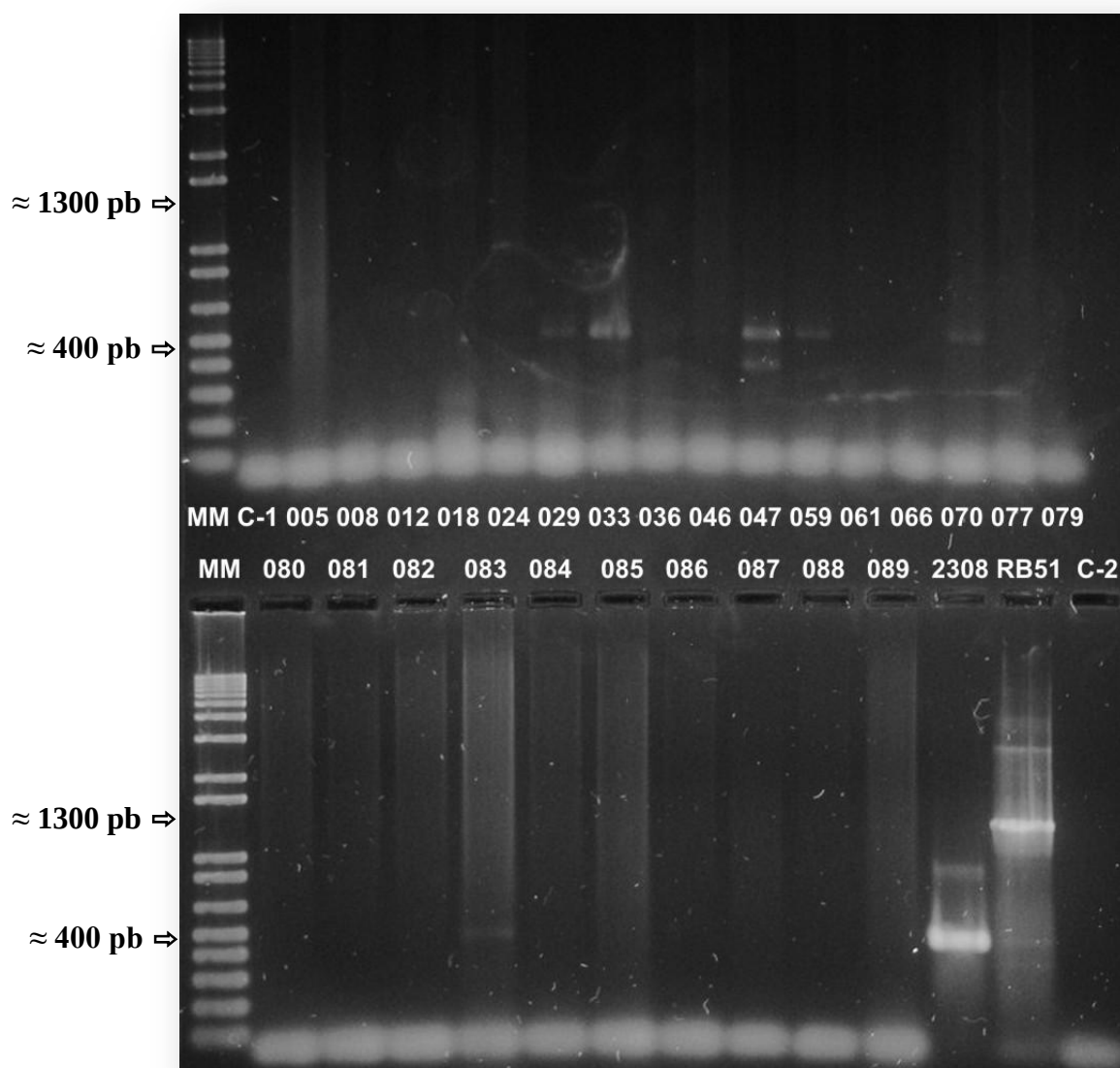


FIGURA 1. Fotodocumentação de gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR GOLD (Invitrogen®) sob transiluminação UV; o par de *primers IS711 AF / CR* geraram bandas de ≈ 400 pb, indicando o DNA de *Brucella* sp. no sangue de *Ozotoceros bezoarticus* (029, 033, 047, 059, 070 e 083); a mesma banda de 400 pb foi observada no controle positivo *B. abortus* 2308, ao contrário da amostra de *B. abortus* RB51, que gerou um produto de ≈ 1300 pb para os *primers* utilizados.

A associação entre os resultados do teste do AAT e a PCR *IS711* e a relação entre o resultado do AAT e a idade das fêmeas de veado-campeiro estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Variáveis de risco associadas à ocorrência de brucelose diagnosticada pelo AAT¹ em uma população de veados-campeiros da região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul, com os respectivos valores de *odds ratio* (OR).

Variáveis de Risco	Categorias	Positivos AAT ¹	Negativos AAT	OR	IC ² inferior	IC superior
PCR <i>IS711</i> ³	Positivos	3	4	12,2500 ⁵	1,8371	81,6839
	Negativos	3	49			
Idade ⁴	Adulta	5	43	1,1628	0,1220	11,0836
	Sub-adulta	1	10			

¹AAT = Teste sorológico para a brucelose do Antígeno Acidificado Tamponado (rosa-bengala).

² IC = Intervalo de Confiança - 95%.

³ PCR *IS711* = Reação de Cadeia de Polimerase utilizando os *primers IS711AF* e *IS711CR* para a detecção de *Brucella sp.*

⁴ Idade: Adulta ≥ 2 anos de idade; Sub-adulta < 2 anos de idade.

⁵ Teste de X^2 , onde $p < 0,05$.

Uma taxa de gestação de 98,21% (55/56) foi observada para o veado-campeiro, sendo possível reencontrar 78,57% (44/56) das fêmeas e monitorá-las durante a estação de nascimentos. Das 44 fêmeas reencontradas, 21 estavam acompanhadas de seus filhotes, outras 21 estavam aparentemente desacompanhadas, uma única fêmea não era gestante e a restante havia sido encontrada morta.

Dentre as variáveis de risco que poderiam estar relacionadas à maior ocorrência de fêmeas encontradas na estação de nascimentos sem os seus filhotes, observou-se associação significativa entre menores idades das fêmeas, traduzida pela primiparidade, e uma menor taxa de encontro de fêmeas com filhotes (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis de risco associadas à ocorrência de fêmeas acompanhadas ou não de seus filhotes em uma população de veados-campeiros da região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul, com os respectivos valores de *odds ratio* (OR).

Variáveis de Risco	Categorias	Fêmeas com filhotes ¹	Fêmeas sem filhotes ²	OR	IC ³ inferior	IC superior
AAT ⁴	Positivos	3	2	1,5833	0,2364	10,6054
	Negativos	18	19			
PCR <i>IS711</i> ⁵	Positivos	2	2	1	0,1274	7,8505
	Negativos	19	19			
Idade ⁶	Adulta	20	13	12,3077 ⁷	1,3733	110,3058
	Sub-adulta (primípara)	1	8			

¹ Fêmeas marcadas reencontradas com filhotes no período das parições.

² Fêmeas marcadas reencontradas sem filhotes no período das parições.

³ IC = Intervalo de Confiança - 95%.

⁴ Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (rosa-bengala).

⁵ PCR *IS711* = Reação de Cadeia de Polimerase utilizando os *primers IS711AF* e *IS711CR*.

⁶ Adulta ≥ 2 anos de idade; Sub-adulta < 2 anos de idade, sendo todas primíparas.

⁷ Teste de X^2 , onde $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A soropositividade estimada para a brucelose em veado-campeiro pelo 2-ME foi de 3,39%, estando próxima da descrita por Aguirre et al. (1995) num levantamento realizado nos parques nacionais dos Estados Unidos, onde 2% (8/456) dos cervídeos (*Cervus elaphus*) foram positivos para *B. abortus*, pelo teste de soroaglutinação no Brewer Diagnostic Card Test® (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD). Para os bovinos da região do Pantanal, a prevalência da brucelose pelo 2-ME foi estimada em 1,36% (Pellegrin et al., 2006).

Se considerarmos como positivos os resultados obtidos no teste do AAT, a taxa de soro-reatores encontrada para a brucelose em cervídeos foi de 10,17%, dado equivalente ao último levantamento epidemiológico realizado em bovinos de corte no Pantanal, onde 12,6% dos animais testados foram positivos para a brucelose pelo AAT (Chate et al., 2009). As taxas de positividade próximas para o veado-campeiro e os bovinos no Pantanal fazem bastante sentido já que estas espécies convivem em simpatria e são estritamente ligadas taxonomicamente.

Tabela 6. Padrão de complementaridade dos testes empregados no diagnóstico da brucelose em uma população de veados-campeiros da região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul, quanto mais escura a escala de cinza mais testes de diagnóstico foram coincidentes em seus resultados.

Identificação do cervídeo	PCR IS711	AAT	2-ME
029	Positivo		
033	Positivo		
047	Positivo		
123	Positivo		
059	Positivo	Positivo	
070	Positivo	Positivo	25I
083	Positivo	Positivo	
008		Positivo	
085		Positivo	
114		Positivo	50 I

Apesar da taxa de positividade de 11,86% obtida pelo diagnóstico molecular para a brucelose estar bem próxima da obtida na sorologia pelo AAT, foi observado que diferentes indivíduos contribuíram para os diagnósticos positivos nos testes utilizados, havendo aparentemente uma complementaridade para os métodos de diagnóstico estudados (Tabela 6). Pela PCR IS711 AF/CR (Vemulapalli et al., 1999) foi detectado o

DNA de *Brucella* sp. circulante no sangue dos cervídeos. No teste do AAT, provavelmente as imunoglobulinas da classe *G1* (*IgG1*), presentes nas infecções recentes por *Brucella* sp., foram as que mais contribuíram para os resultados positivos. E por último, a prova de 2-ME teve a sua importância na detecção dos anticorpos *IgG*, presente nos casos de brucelose crônica (Brasil, 2006).

Para o diagnóstico do gênero *Brucella* sp. pela PCR foi utilizado como referência o elemento genético *IS711* que interrompe a cadeia de nucleotídeos do gene *wboA* presente em *Brucella* sp., sendo responsável pela codificação da glicosiltransferase, necessária para a biossíntese do antígeno “O” de membrana (Vemulapalli et al., 1999).

Em todas as sete amostras de veado-campeiro positivas para brucelose pela PCR *IS711* (Fig. 1) foram amplificados produtos de aproximadamente 400 pb que podem pertencer à qualquer espécie de *Brucella* sp., exceto à cepa *B. abortus* RB51, a qual gera um produto de $\approx$ 1300 pb devido ao elemento de interrupção *IS711J* (semelhante ao *IS711*) no gene *wboA*, acarretando em 862 pb a mais no produto amplificado (Vemulapalli et al., 1999).

O par de *primers IS711 AF/CR* não detecta o DNA de *Yersinia enterocolitica* O:9 e *Ochrobactrum anthropi* (Vemulapalli et al., 1999), bactérias que são relacionadas à *Brucella* sp. sorológica (Etter e Drew, 2006) e geneticamente (Romero et al., 1995), reduzindo as interferências das reações cruzadas de diagnóstico.

A associação significativa entre os diagnósticos positivos para brucelose pelo AAT e pela PCR *IS711* (Tabela 4) evidenciou uma vantagem em se trabalhar com testes sorológicos e moleculares em paralelo. Quando padronizadas para os veados-campeiros, tais técnicas usadas juntas podem reduzir os falsos diagnósticos, facilitando a interpretação dos resultados que conduzem as medidas de controle da brucelose. Schumaker et al. (2010) demonstrou que em *Cervus elaphus* nos EUA o uso das técnicas moleculares de diagnóstico evitaram que reações sorológicas cruzadas para *Y. enterocolitica* O:9 fossem atribuídas à *B. abortus*.

Na mesma região deste estudo, Elisei et al. (2010) encontraram uma prevalência de 20,4% (9/44) para *Brucella* sp. em veados-campeiros pela PCR com *primers* para o gene *VirB5* (Hartigh et al., 2004), sugerindo que a brucelose poderia ser um problema entre os cervídeos. Contudo, na presente investigação não houve associação significativa entre a ocorrência de fêmeas observadas sem filhotes na estação de parição

e os resultados positivos para a brucelose tanto pela prova do AAT, como pela PCR *IS711* (Tabela 5).

Observou-se que dentre as fêmeas gestantes, as sub-adultas (primíparas) tinham muito mais chances (OR = 12,3077) de serem encontradas sem filhotes na estação de parição (Tabela 5). Nos rebanhos bovinos com brucelose crônica os abortos concentram-se nas fêmeas primíparas (Brasil, 2006). Apenas duas das dez fêmeas de veado-campeiro primíparas foram positivas para brucelose, sendo assim, a maior taxa de fêmeas sub-adultas sem filhotes não parece estar relacionada com a infecção por *Brucella* sp.

As fêmeas adultas de veado-campeiro costumam parir antes do início das chuvas no Pantanal. Já as fêmeas sub-adultas concebem os seus filhotes mais tardiamente, pois só são cobertas após atingirem a maturidade sexual e terem o primeiro período estral. Este atraso natural pode conferir menores chances de sobrevivência aos filhotes das mães primíparas, devido à restrição do ambiente e dos alimentos (forrageiras) imposta pela inundação, além da dispersão dos predadores que acompanham os cursos d'água (jacaré, sucuri) (Lacerda, 2008).

As taxas de positividade encontradas para a brucelose na população de veados-campeiros estiveram de acordo com as descritas na região e os testes de diagnóstico do AAT, 2-ME e da PCR *IS711* tiveram aparente tendência de complementaridade na detecção da *Brucella* sp. Os testes do AAT e da PCR *IS711* apresentaram associação significativa pelo teste de *odds ratio*, o que conferiu maior confiabilidade aos resultados encontrados. Neste estudo a brucelose não foi significativamente associada às fêmeas de veado-campeiro encontradas sem os seus filhotes na estação de nascimento, situação que esteve relacionada com a idade reprodutiva destas fêmeas que eram primíparas.

LITERATURA CITADA

- Abreu, U.G.P. 2002. Sistema de Produção de Gado de Corte do Pantanal Importância Econômica In: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) pp 9-13
- Aguirre, A. A.; Hansena, D. E.; Starkeyb, E. E.; Mclean, R.G. 1995. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. Preventive Veterinary Medicine V. 21, pp. 313-322

- Anderson, M.L. 2007. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*. 68:474–486.
- Araújo, F. R., Ramos, C.A.N., Luíz, H.L., Schabib-Péres, I.A.H.F., Oliveira, R.H.M., Souza, I.I.F., Russi, L.S. 2009. Avaliação de um Protocolo de Extração de DNA Genômico a Partir de Sangue Total. Comunicado Técnico 120, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 5p.
- Bengis, R. G.; Kock, R. A.; Fischer, J. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*, v.21 (1), p.53-65.
- Brasil, 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 192p.
- 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, J.S.; Ferreira Neto, J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61 (1): 46-55.
- Corbel, M.J. 2006 *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health. 102p.
- Duarte, J. M. B. e M. L. Merino. 1997 Taxonomia e evolução. *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Jaboticabal. p.1-22.
- Duarte, J.M.B. 2007. Artyodactyla – Cervidae (Veado-catingueiro, Veado-campeiro, Cervo-do-pantanal). *In: Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária*. 1ª ed. Roca, São Paulo, p.641-664.
- Elisei, C., Pellegrin, A., Tomas, W.M., Soares, C.O., Araújo, F.R., Funes-Huacca, M.E., Rosinha, G.M.S. 2010 Evidência molecular de *Brucella* sp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(6):503-509.
- Etter, R. P., e M. L. Drew. 2006. Brucellosis in elk of eastern Idaho. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 271–278.
- Godfroi, J. 2002 Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*, 21: 277-286.

- Hartigh, A. B.; Sun, Y.; Sondervan, D.; Heuvelmans, N.; Reinders, M. O.; Ficht, T. A.; Tsolis, R. M. 2004. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*. 72:5143-5149.
- Kreeger, T., Cook, W., Edwards, W., Elzer, P. e Olsen, S. 2002. *Brucella abortus* strain rb51 vaccination in elk ii. Failure of high dosage to prevent abortion. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), pp. 27–31.
- Lacerda, A.C.R. 2008. Ecologia e estrutura social do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal [tese] Brasília (DF): UnB, Doutorado; 194p.
- Mackintosh, C., Haigh, J.C., Griffin, F. 2002. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*. 21(2):249-263.
- Mörner, T., Obendorf D.L. Artois M. Woodford M. H. 2002. Surveillance and monitoring of wildlife diseases *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*, 21 (1), 67-76.
- OMS. 1986. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Organización Mundial de la Salud, Genebra. Serie de Informes Técnicos. 740:149.
- Paulin, L.M. 2003 Brucelose. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.70, n.2, p.239-249.
- Pellegrin, A.O., Leite, R.M.H., Sereno, J.R.B., Lage, A.P., Leite, P.C., Leite, R.C. e Ravaglia, E. 2006. Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares Comunicado Técnico 58, Corumbá, 4p.
- Ridler, A. 2001. *Brucella ovis* infection in deer surveillance 28(3) pp. 06-08
- Romero, C., Gamazo C., M. Pardo, and I. Lopez-Goni. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:615–617.
- Santos, S.A. 2002. Aspectos Agro e Zoológicos. *In: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS)* pp 14-17.
- Schumaker, B.A.; Mazet, J.A.K.; Gonzales, B.J.; Elzer, P.H.; Hietala, S.K.; Ziccardi, M.H. 2010. Evaluation of the western immunoblot as a detection method for *Brucella abortus* exposure in elk. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(1): 87–94.
- Tiepolo, L.M. e W.M. Tomas. 2006. *Ordem Artiodactyla. Mamíferos do Brasil*. Sema, Londrina, p.268-288.
- Uhart, M., Mangine, P., Gauvez, C., Corti, P., Milano, F., Jorge, M., Girio, R., Mathias, L., Schettino, A., Catena, M., Terragno, R. e Aprile, G. 2010. Bacterial Diseases. *In:*

Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer FUNEP/IUCN São Paulo pp.342-362.

- USDA, 2008. Evaluation of the brucellosis and bovine tuberculosis status of bison and elk in Elk Island National Park, Canada. Veterinary Services Animal and Plant Health Inspection Service United States Department of Agriculture. 63 p.
- Vemulapalli R., Mcquiston J., G. Schurig, Sriranganathan N., Halling S., e Boylei. S., 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 6, 760–764.
- Walker, R.L. 2003. *Brucella*. In: Microbiologia Veterinária, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 185-191.
- Witter, J. F. 1981. Brucellosis. Infectious diseases of wild mammals. 2 ed. Iowa. p. 280-287.
- Wobeser, G. 2002 Disease management strategies for wildlife. Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties, 21:159-178.
- Wobeser, G.A. 2006 Essentials of Disease in Wild Animals. Blackwell Publishing, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 243p.

VARIÁVEIS DE RISCO ASSOCIADAS À OCORRÊNCIA DA LEPTOSPIROSE E ÀS TAXAS REPRODUTIVAS EM VEADO-CAMPEIRO (*OZOTOCEROS BEZOARTICUS*) NA REGIÃO DA NHECOLÂNDIA, CORUMBÁ, MS, BRASIL

Igor A. H. F. Schabib-Péres^{1,3} e Aiesca O. Pellegrin²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Av. Senador Filinto Müller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-342, Brasil.

² Embrapa Pantanal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, R. 21 de Setembro, 1880, Corumbá, MS, Caixa Postal 109, 790320-900, Brasil.

³ Autor para correspondência (e-mail: igorale_vet@hotmail.com).

ABSTRACT: The *Leptospira interrogans* is one of the main etiological agents that affect a great number of domestic species, savages and the man. The pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) shares of the same biological habits of the domestic ruminants in the Pantanal, competing for the same foods and being attacked by the same diseases. The present study was developed in the Southwest of region of Nhecolândia (Corumbá, MS, Brazil), tends as objectives to accomplish an inquiry by serology and molecular diagnosis of the frequency of the leptospirosis in pampas-deer, besides to evaluate which the risk variables related with the leptospirosis and associated to the occurrence of females of these cervids without their nestlings in the birth station. 56 females and three males of the pampas deer were captured and identified for the obtaining of sanguine serum and total blood for the serological and molecular diagnosis for PCR of the leptospirosis. In all the females ultrasound scan was accomplished, tends as result a tax of gestation of 98,21% (55/56). The proportion of serum-reactors found by microagglutination test (MAT) it was of 28,81% (17/59) and the serovars pomona and autumnalis were diagnosed in 64,71% (11/17) and 29,41% (5/17) of the positive animals, respectively. Being used the primers *G1/G2* and *lep1/lep2* the DNA of *Leptospira sp.* was not detected in the blood of any cervid. The risk factors associated to the positive diagnosis of the leptospirosis were the medium rectal temperatures above 38,76 °C and the cervid's groups formed by three or more individuals. For the occurrence of pampas deer females without nestlings during the birth period the primiparety was indicated as risk variable.

Key words: *Ozotoceros bezoarticus*, leptospirosis, occurrence, serovars, risk variables, reproductive impact.

RESUMO: A *Leptospira interrogans* é um dos principais agentes etiológicos que afetam um grande número de espécies domésticas, selvagens e o homem. 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. O presente estudo foi desenvolvido no Sudoeste da região da Nhecolândia (Corumbá, MS, Brasil), tendo como objetivos realizar um inquérito por meio de técnicas sorológicas e moleculares de diagnóstico sobre a frequência da leptospirose em veado-campeiro, além de avaliar as variáveis de risco

relacionadas com a leptospirose e associadas à ocorrência de fêmeas de veado-campeiro sem filhotes na estação de parição. Foram capturadas e identificadas 56 fêmeas e três machos de veado-campeiro para a obtenção de sangue total e soro sanguíneo para o diagnóstico molecular por PCR e sorológico da leptospirose. Em todas as fêmeas foi realizada ultra-sonografia, tendo como resultado uma taxa de gestação de 98,21% (55/56). A proporção de soro-reatores pela Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi de 28,81% (17/59) e os sorovares pomona e autumnalis foram diagnosticados em 64,71% (11/17) e 29,41% (5/17) dos animais positivos, respectivamente. Utilizando-se os primers *G1/G2* e *lep1/lep2* não foi detectado DNA de *Leptospira* sp. no sangue de nenhum cervídeo. Foram identificadas como variáveis de risco associadas ao diagnóstico positivo da leptospirose as temperaturas retais médias acima de 38,76 °C e os grupos de cervídeos formados por três ou mais indivíduos. Para a ocorrência de fêmeas de veado-campeiro sem filhotes durante o período de parição a primiparidade foi indicada como variável de risco.

Palavras-chave: *Ozotoceros bezoarticus*, leptospirose, sorologia, PCR, sorovares, variáveis de risco, impacto reprodutivo.

INTRODUÇÃO

Amplamente difundida pelo mundo, principalmente nas áreas tropicais de grandes índices pluviométricos, com solos alcalinos ou neutros, a leptospirose acomete o homem, animais domésticos e selvagens (Corrêa, 2007). As características zoo-ambientais do Pantanal, tais como o regime sazonal de inundações, e a abundante presença do gado em contato com a fauna (Pellegrin, 1999; Santos, 2002) são sugestivas da ocorrência de *Leptospira interrogans* em diferentes hospedeiros-resevatórios. Reações soropositivas já foram encontradas em cervídeos na região (Mathias et al., 1999; Girio et al., 2004).

A transmissão da leptospirose ocorre principalmente pelo contato direto das mucosas e da pele macia e úmida com o agente etiológico que é eliminado no ambiente principalmente pela urina de animais infectados (Levett, 2001). As infecções verticais congênita-transplacentária, mamária ou neonatal também são possíveis (Faine et al., 1999), assim como a via venéria em bovinos, ratos, porcos e cães (WHO, 2003; Le Febvre, 2003) e a transmissão indireta por fômites, abrasões, insetos hematófagos e ingestão de alimentos ou água com leptospirosas (Faine et al. 1999).

Da mesma forma que nos bovinos, em cervídeos *L. interrogans* também ocasiona o aborto, infertilidade e outras alterações reprodutivas (Faine et al., 1999),

podendo haver, no caso de infecção pela sorovar pomona, a morte das fêmeas gestantes ou dos recém-nascidos provocada pela Síndrome Hemolítica (Mackintosh et al., 2002).

O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) é um cervídeo, ruminante selvagem com características biológicas semelhantes aos bovinos, utilizando os mesmos campos para se alimentar, agregando-se muitas vezes ao gado e sendo afetado por doenças em comum (Duarte e Merino, 1997; Tiepolo e Tomas, 2006; Duarte, 2007; Lacerda, 2008).

A população de veados-campeiros foi reduzida ao longo do século passado e continua diminuindo em algumas regiões, devido à alteração e fragmentação do seu habitat, à caça ilegal e às implicações do contato com o gado e espécies exóticas (Demaría et al., 2003; González et al., 2010a). Formaram-se na América do Sul metapopulações com pouca diversidade genética, promovendo a endogamia e a depressão gênica (González et al., 2010b). As doenças dos animais introduzidos pelo homem num ambiente podem encontrar organismos selvagens susceptíveis e com pouca variabilidade entre si, agravando os riscos da extinção (Merino et al., 1997).

É importante manter a vigilância e o monitoramento das doenças que possam atingir vários grupos taxonômicos, especialmente nas áreas onde os sistemas de produção estão em estrito contato com a natureza (Mörner et al., 2002). Para que um programa de controle sanitário reduza as perdas para animais selvagens e domésticos, são necessários dados sobre o agente etiológico, a susceptibilidade dos hospedeiros, a biologia das espécies envolvidas e as interações que ocorrem entre estas e o ambiente, elucidando as vias epidemiológicas que possibilitam a disseminação da doença (Wobeser, 2002; Godfroid, 2002; Wobeser, 2006).

Este estudo teve como objetivos: efetuar um inquérito sobre a frequência da leptospirose em veado-campeiro no sudoeste da região da Nhecolândia (Corumbá, MS, Brasil) com o emprego de técnicas diagnósticas que demonstram a presença de anticorpos e do DNA do microrganismo, além de avaliar as variáveis de risco relacionadas com a leptospirose e associadas à ocorrência de fêmeas de veado-campeiro sem filhotes na estação de parição.

MATERIAIS E MÉTODOS

Período e local do estudo

As capturas, identificação dos animais, coletas de amostras biológicas e o diagnóstico de gestação foram realizados no mês de julho de 2009, sendo os animais

monitorados quanto às parições e a sobrevivência dos adultos e filhotes nascidos até junho de 2010.

A área do estudo estava totalmente localizada na sub-região pantaneira da Nhecolândia, município de Corumbá-MS, Brasil, tendo aproximadamente 20.000 ha de extensão e contemplando três propriedades rurais de criação extensiva de gado de corte.

As coordenadas geográficas dos locais das capturas foram obtidas por aparelho de geo-referenciamento e anotadas juntamente com a descrição fitofisionômica circundante para orientar o posterior monitoramento dos animais.

Contenção dos animais e tratamento das amostras

Cinquenta e seis fêmeas e três machos de veado-campeiro foram capturados utilizando-se uma pistola de propulsão pneumática (Modelo 35, Distinject[®], Suíça) para dardos tranqüilizantes que continham uma preparação anestésica conforme a Tabela 1.

TABELA 1. Doses dos fármacos utilizados nos dardos anestésicos para a contenção química em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) adultos e subadultos.

Peso Estimado	Fármaco	Apresentação	Dose/Kg	Dose/animal	Volume/dardo
30 kg (animal adulto)	Tiletamina-Zolazepam	50 mg/ml	2,5 mg	75,0 mg	1,5 ml
	Xilazina	20 mg/ml	1 mg	30 mg	1,5 ml
	Atropina	10 mg/ml	0,05 mg	1,5 mg	0,15 ml
20 kg (animal subadulto)	Tiletamina-Zolazepam	50 mg/ml	1,84 mg	33,33 mg	0,73 ml
	Xilazina	20 mg/ml	1,11 mg	22,2 mg	1,11 ml
	Atropina	10 mg/ml	0,06 mg	1,2 mg	0,12 ml

Após o término dos procedimentos no animal, revertia-se o efeito da xilazina com a aplicação da ioimbina (Tabela 2). Durante a anestesia todos os cervídeos tiveram sua temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória e reflexos monitorados a cada 15 minutos, sendo inspecionados clinicamente e identificados com coleiras e brincos numerados.

TABELA 2. Doses da ioimbina utilizada como reversora da xilazina em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) adultos e subadultos.

Fármaco	Peso Estimado	Apresentação	Dose/Kg	Dose/animal	Volume/dardo
Ioimbina	30 Kg	3 mg/ml	0,2 mg	6 mg	2 ml
	20 Kg	3 mg/ml	0,2 mg	4 mg	1,33 ml

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção em frascos com e sem EDTA sódico, respectivamente, para obtenção do sangue não coagulado e do soro sanguíneo. O material foi mantido a -4 °C em isopor com bolsas de gelo até o término de cada dia de trabalho, sendo então aliquotado e armazenado em *freezer* a -20 °C no laboratório da Fazenda Nhumirim.

Este projeto teve aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que permitiu a anestesia e coleta de material biológico desta espécie selvagem sob o N° de autorização: 20029-1 / código de autenticação: 69745473.

Diagnóstico de gestação

Todas as fêmeas de veado-campeiro foram submetidas ao diagnóstico de prenhez por palpação abdominal direta, auscultação dos batimentos cardíacos fetais e ultra-sonografia transabdominal com sonda transdutora linear e o aparelho de ultra-som (CTS-385V, Shantou Institute of Ultrasonc Instruments [SIUI] Inc., Hong Kong, China) multifrequencial, com variações entre 5 e 7,5 Mhz de frequência permitindo a visualização do feto. O diagnóstico positivo da prenhez era dado quando eram visualizados os batimentos cardíacos fetais (BCF), os placentomas e outras estruturas do feto. Na estação de parição de 2009 (agosto-outubro), as fêmeas identificadas de veado-campeiro, quando encontradas, foram monitoradas até o nascimento de suas crias para a constatação do sucesso reprodutivo.

Diagnóstico sorológico

Cinquenta e nove alíquotas de soro sanguíneo de veado-campeiro foram encaminhadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, para o diagnóstico de leptospirose pela reação de soroaglutinação microscópica (SAM). Como antígeno para a *Leptospira interrogans* foram utilizadas 24 variantes sorológicas (australis, bratislava, autumnalis, butembo, castellonis, bataviae, canicola, whitcomb, cynopteri, grippotyphosa, hebdomadis, copenhageni, pyrogenes, panama, icterohaemorrhagiae, javanica, pomona, hardjo [hardjoprajitno], wolffi, hardjo [hardjobovis], shermani, tarassovi, patoc, sentot), de 19 sorogrupos, na forma de culturas vivas provenientes da coleção de referência do VPS. As amostras foram

consideradas positivas quando ocorria sorroaglutinação igual ou superior a 50% das células do campo em comparação com o controle negativo. Os soros positivos foram então diluídos seriadamente a partir da diluição inicial (1:100) até a diluição de 1:6.400, e acrescidos de cada uma das 24 sorovariantes de referência, tendo como o título de anticorpos final o inverso da maior diluição em que houve ao menos 50% de leptospiras aglutinadas por campo microscópico.

Diagnóstico molecular

A partir das amostras de sangue total dos veados-campeiros foi extraído o DNA genômico (Araújo et al. 2009) no Laboratório de Biologia Molecular Animal da Embrapa Gado de Corte (CNPGC), Campo Grande-MS.

Para o diagnóstico de *Leptospira* sp. pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados dois pares de iniciadores, *G1/G2* (5' CTGAATCGCTGTATAAAAGT 3' e 5' GGAAAACAAATGGTCGGAAG 3') que amplificam produtos de 285 pares de bases (pb) (Cheema et al., 2007) e *lep1/lep2* (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3' e 5' TTCCCCCATTTGAGCAAGATT 3') que correspondem aos nucleotídeos 38 ao 57 e 348 ao 368 da estrutura do gene *rrs* (16S) e amplificam 331 pb (Mérien et al, 1992).

Os controles positivos referentes ao DNA extraído de *Leptospira interrogans*, sorovares pomona, autumnalis e hardjo (*hardjobovis*) foram obtidos no banco de referência da Embrapa Gado de Corte e Embrapa Pantanal.

A solução da PCR *G1/G2* foi preparada em microtubos de 200 µl sendo constituída por: 2,5 µl de Tampão PCR 10X; 1,5 µl de MgCl₂ (1,5 mM); 1,0 µl de nucleotídeos (dNTP's, numa concentração de 250 µM); 1,0 µl de cada *primer* (5 pmoles); 0,2 µl de *Taq*DNA-polimerase (1,0 UI); 1,0 µl do DNA (100 ng/µl) a ser testado; e H₂O (*Mili-Q*[®]) em quantidade suficiente para (q.s.p.) completar 20 µl de volume final. Para a PCR *lep1/lep2* a solução de trabalho continha: 3,0 µl de Tampão PCR 10X; 0,6 µl de MgCl₂ (1,5 mM); 0,5 µl de dNTP's (250 µM); 1,5 µl de cada *primer* (5 pmoles); 0,3 µl de *Taq*DNA-polimerase (1,0 UI); 1,0 µl do DNA (100 ng/µl) a ser testado; e o restante de H₂O (*Mili-Q*[®]) q.s.p. 20 µl de volume final.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler Gradient[®]). Na PCR com os *primers G1/G2* utilizou-se como referência o protocolo de desnaturação, anelamento e extensão de Cheema et al. (2007). Para a PCR *lep1/lep2* a desnaturação inicial foi realizada a 95 °C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C / 30 segundos, anelamento

a 58 °C / 30 segundos, extensão a 72 °C / 1 minuto e uma extensão final a 72 °C / 10 minutos, para a adenilação da sequência formada.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese de 80 a 100 V por 1 hora em gel de agarose em concentrações de 0,8 a 1,5 %. O gel foi corado com SYBR GOLD (Invitrogen®) e visualizado pelo aparelho transluminador (Lpox HE, Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta, sendo as bandas fotodocumentadas.

Delineamento e tratamento dos dados

Para a *Leptospira interrogans* considerou-se presuntivamente como animais portadores os positivos na sorologia. As unidades amostrais consideradas foram os cervídeos que eram positivos ou negativos para os testes diagnósticos empregados. Este trabalho teve um tratamento observacional (descritivo), onde não houve a interferência do pesquisador nos dados coletados.

Foram utilizados dois delineamentos: o levantamento das fêmeas gestantes de veado-campeiro e da ocorrência de *L. interrogans* na amostra estudada; e o estudo das variáveis associadas ao diagnóstico positivo da leptospirose e ao impacto reprodutivo nos cervídeos, constatado pela observação de fêmeas acompanhadas ou não de seus filhotes na estação de parição. Considerando-se que o projeto teve como foco principal populações selvagens, estabeleceu-se uma amostragem mínima baseada em inquéritos anteriores, na prevalência estimada para as doenças (50%), num erro aceitável de 10% (95% de confiança) e na capacidade operacional da equipe.

A proporção amostral (Pa) de animais soro-reatores para a leptospirose em veado-campeiro foi calculada pela fórmula $Pa = n/N \times 100$, onde:

n = número de cervídeos positivos pela SAM (no local e período descritos);

N = número total de cervídeos amostrados (no local e período descritos).

Os resultados das fichas de campo e dos testes de diagnóstico foram armazenados em planilhas computacionais (Microsoft Excel® 2007), sendo posteriormente associados às variáveis de risco em tabelas de contingência do tipo 2 x 2 para as estimativas de *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%. O teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram empregados nas associações significativas de OR com $p < 0,1$ ou $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do pacote computacional BioEstat 4.0 (Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 2006, Belém/PA, Brasil).

RESULTADOS

Dos 59 veados-campeiros capturados, 17 apresentaram reações de aglutinação no teste da SAM, conferindo uma proporção de soro-reatores de 28,81% para a leptospirose nestes animais (Tabela 3). Onze cervídeos (64,71%) apresentaram soroprecipitação para *L. interrogans* sorogrupo Pomona, sorovar pomona e cinco animais (29,41%) aglutinaram para *L. interrogans* sorogrupo Autumnalis, sorovar autumnalis. Houve ainda um animal (5,88%) que apresentou co-aglutinação com títulos iguais para as sorovares autumnalis e pomona, sendo este indivíduo considerado no cálculo da proporção amostral de soro-reatores à leptospirose, porém não contabilizado nas proporções para as diferentes sorovares.

TABELA 3. Títulos sorológicos e sorovares reagentes para *L. interrogans* em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no sudoeste da Nhecolândia, Corumbá-MS.

Nº Identificação	Positivos pela SAM ¹	Sorovar
005	13A ² = 400	pomona
018	2A ³ = 100	autumnalis
029	2A = 200; 13A = 400	pomona
047	2A = 100	autumnalis
059	13A = 800	pomona
061	2A = 100; 10A ⁴ = 100; 13A = 1600	pomona
082	2A = 400; 13A = 400	pomona e autumnalis
089	2A = 200	autumnalis
084	13A = 6400	pomona
095	2A = 200	autumnalis
096	2A = 400; 13A = 800	pomona
097	13A = 400	pomona
099	13A = 3200	pomona
105	13A = 800	pomona
111	2A = 400; 13A = 1600	pomona
115	2A = 400	autumnalis
116	13A = 800	pomona

¹ SAM = Soro Aglutinação Microscópica

² 13A: código usado pelo VPS - USP para a *L. interrogans*, sorogrupo pomona, sorovar pomona

³ 2A: código usado pelo VPS - USP para a *L. interrogans*, sorogrupo autumnalis, sorovar autumnalis

⁴ 10A: código usado pelo VPS - USP para a *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar copenhageni.

As soroprecipitações para a sorovar pomona tiveram títulos maiores do que os obtidos para a sorovar autumnalis (Fig.1).

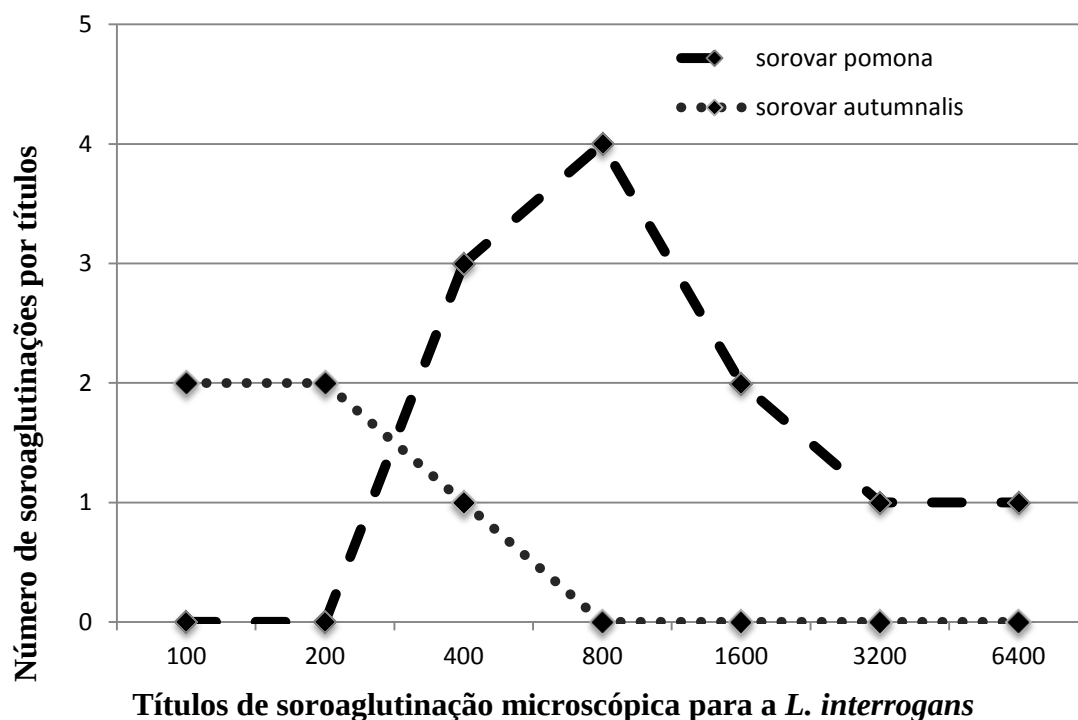


FIGURA 1. Número de cervídeos positivos no teste de soroprecipitação microscópica (SAM) categorizado pelos títulos das sorovares de *L. interrogans* diagnosticadas.

Os resultados dos diagnósticos por meio da PCR foram contraditórios aos da sorologia, não sendo possível detectar DNA de leptospiros nas amostras de sangue total dos cervídeos analisados, mesmo utilizando-se *primers* sensíveis (*G1/G2* e *lep1/lep2*) que funcionaram adequadamente na detecção dos controles positivos utilizados.

A Tabela 4. sumariza as variáveis de risco associadas à ocorrência da leptospirose em veado-campeiro.

Uma taxa de gestação de 98,21% (55/56) foi observada nas fêmeas de veado-campeiro capturadas, sendo reencontradas posteriormente 78,57% (44/56) destas, durante o monitoramento das parições. 21 veadas estavam acompanhadas de seus filhotes, outras 21 estavam aparentemente desacompanhadas, outra era a única que não foi positiva no diagnóstico de gestação e a última foi encontrada morta, totalizando as 44 fêmeas reencontradas e monitoradas.

TABELA 4. Variáveis de risco para a leptospirose em uma população de veados-campeiros da região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul, com os respectivos valores de *odds ratio* (OR).

Variáveis de risco	Categorias	Positivos Leptospirose	Negativos Leptospirose	OR	IC ⁱ inferior	IC superior
Idade ⁱⁱ	Adulta	15	33			
	Sub-adulta	2	9	2,0455	0,3931	10,6431
Fitofisionomia	Baía	5	5			
	Vazante	6	21	3,5000	0,7532	16,2838
	Baía	5	5			
	Campo	6	16	2,6667	0,5634	12,6228
	Campo	6	16			
	Vazante	6	21	1,3125	0,3558	4,8411
Indivíduos/Grupo	1 ou 2	3	18			
	≥ 3 ⁱⁱⁱ	13	19	4,1053 ^v	1,0010	16,8362
Temperatura Retal Média ^{iv}	Alta	7	6			
	Normal	7	24	4,0000 ^v	1,0087	15,8624
	Alta	7	6			
	Baixa	3	12	4,6667	0,8783	24,7963
	Normal	7	24			
	Baixa	3	12	1,1667	0,2552	5,3327

ⁱ IC = Intervalo de Confiança - 95%.

ⁱⁱ Idade: Adulta ≥ 2 anos de idade; Sub-adulta < 2 anos de idade.

ⁱⁱⁱ Grupos de 3 a 11 animais.

^{iv} Temperatura Retal Média = média de 3 a 5 aferições de temperaturas realizadas durante a contenção química dos animais, onde: Baixa < 37,76 °C; Normal = 38,26 °C (± 0,5 °C); Alta > 38,76 °C.

^v Teste de X², onde p < 0,1.

Dentre as 21 fêmeas acompanhadas de filhotes saudáveis, cinco (23,81%) tiveram diagnóstico positivo para leptospirose pela SAM, três destas aglutinaram para a sorovar pomona, uma para a sorovar autumnalis e uma apresentou co-aglutinação para as duas sorovares. Nas 21 fêmeas que não estavam acompanhadas de seus filhotes, foram obtidos oito diagnósticos positivos para leptospirose, sendo cinco para a sorovar pomona e três para a sorovar autumnalis. As variáveis de risco associadas à ocorrência de fêmeas de veado-campeiro sem filhotes estão apresentados na Tabela 5.

A única fêmea não gestante era sub-adulta, sendo uma das menos desenvolvidas da população estudada. A fêmea morta foi localizada três meses após as coletas de material biológico, ainda com a coleira de identificação (Nº 099) e sem sinais que evidenciassem morte por predação ou acidente ofídico. A carcaça estava parcialmente consumida, sobretudo as vísceras, impossibilitando a coleta dos órgãos de eleição para

exames *post mortem*. Esta fêmea teve diagnóstico positivo pela SAM para a *L. interrogans* sorovar pomona, com título de 3200.

TABELA 5. Variáveis de risco associadas à ocorrência de fêmeas acompanhadas ou não de seus filhotes em uma população de veados-campeiros da região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul, com os respectivos valores de *odds ratio* (OR).

Variáveis de Risco	Categorias	Fêmeas com filhotes ¹	Fêmeas sem filhotes ²	OR	IC ³ inferior	IC superior
Idade ⁴	Adulta	20	13			
	Sub-adulta (Primíparas)	1	8	12,3077 ⁷	1,3733	110,3058
Leptospirose (SAM ⁵)	Positiva	5	8			
	Negativa	16	13	1,9692	0,5179	7,4884
Temperatura Retal Média ⁶	Baixa	7	2			
	Normal	11	13	4,1364	0,7083	24,1568
	Baixa	7	2			
	Alta	3	6	7,0000	0,8612	56,8967
	Normal	11	13			
	Alta	3	6	1,6923	0,3411	8,3966

¹ Fêmeas marcadas reencontradas com filhotes no período das parições.

² Fêmeas marcadas reencontradas sem filhotes no período das parições.

³ IC = Intervalo de Confiança - 95%.

⁴ Idade: Adulta $\geq$ 2 anos de idade; Sub-adulta $<$ 2 anos de idade, sendo todas primíparas.

⁵ SAM = Soroaglutinação Microscópica

⁶ Temperatura Retal Média = média de 3 a 5 aferições de temperaturas realizadas durante a contenção química dos animais, onde: Baixa $<$ 37,76 °C; Normal = 38,26 °C ($\pm$ 0,5 °C); Alta $>$ 38,76 °C.

⁷ Teste do X^2 , onde $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A proporção de animais soro-reatores de 28,81% para a leptospirose em veado-campeiro é corroborada por Mathias et al. (1999) que obteve 24% de positividade em 17 veados-campeiros do Pantanal Sul-matogrossense utilizando o mesmo teste de diagnóstico. Em outro levantamento pelo teste da SAM feito na mesma região, Gírio et al (2004) encontrou uma taxa de soropositividade de 9,7%.

O teste da SAM não foi validado para o veado-campeiro e, portanto, o ponto de corte (diluição mínima do soro) para considerar os animais soropositivos ainda precisa ser estabelecido, principalmente porque para uma espécie selvagem deve ser levada em conta a evolução adaptativa entre hospedeiro e patógeno no ambiente natural. Títulos que variaram entre 50 e 200 podem ser subestimados utilizando-se os valores de referência para o diagnóstico da leptospirose nas espécies domésticas.

Neste estudo, as sorolaglutinações para a sorovar pomona apresentaram em geral títulos maiores do que os obtidos para o sorovar autumnalis (Fig.1), o que pode ser explicado pelo fato dos cervídeos reagirem fortemente às hematoxinas produzidas pela sorovar pomona (Faine et al., 1999).

Mackintosh et al. (2002) descreve que em veados-vermelhos (*Cervus elaphus*) os casos de infecção por *L. interrogans* sorovar pomona podem evoluir para a forma clínica denominada doença hemolítica, ocorrendo síndromes hiperagudas que levam a morte com febre, anorexia e hemoglobínúria. A fêmea encontrada morta soro-aglutinou positivamente para sorovar pomona com um título de 3200 e sem sinais aparentes de outra causa de morte, podendo seu caso estar relacionado com a doença hemolítica.

No local deste estudo, ainda não havia sido descrito em veados-campeiros o sorovar autumnalis, anteriormente apenas as variantes sorológicas hardjo, mini, wolfi (Mathias et al., 1999; Gírio et al., 2004) e, recentemente, pomona (Vieira, 2009) foram encontradas nesta espécie. A abundante população de porcos-monteiros (*Sus scrofa feral*) no Pantanal pode estar favorecendo a disseminação de sua sorovar específica pomona para outros animais selvagens, pois as sorovares de *L. interrogans* tendem a ser mantidas em seus hospedeiros reservatórios (Levett, 2001). O porco-monteiro é um animal exótico que se adaptou e proliferou no Pantanal, causando desequilíbrio no ecossistema, competindo pelos recursos de muitas espécies nativas e podendo transmitir doenças aos animais e ao homem (Mourão et al., 2002).

A PCR não foi capaz de diagnosticar animais positivos para a leptospirose através do DNA extraído das amostras de sangue total. O uso do sangue como amostra clínica parece ser um dos possíveis motivos para a não detecção dos portadores fora do período de bacteremia. Sabe-se que as leptospirosas possuem um curto período de circulação no sangue dos ruminantes, por volta de 7-14 dias (Lemos e Almeida, 2005), sendo rapidamente destruídas com a posterior opsonificação humoral e fagocitose celular (Faine et al., 1999). Existem protocolos eficientes para a realização da PCR a partir de amostras de urina (Van Eys et al., 1991) que é a principal via de eliminação das leptospirosas no ambiente. Este tipo de material poderia ser explorado em estudos futuros com cervídeos, já que durante a contenção química destes animais é comum ocorrer a micção decorrente da anestesia com zolazepam e tiletamina.

Observou-se que os cervídeos que apresentam febre, expressada pela temperatura retal média (TRM) acima de 38,76 °C, durante a anestesia possuem cerca de quatro vezes mais chances (OR = 4,0000) de estarem com leptospirose do que os

indivíduos que permaneceram com a TRM normal ($38,26^{\circ}\text{C} \pm 0,5$) (Tabela 4). A Febre é um sintoma comum descrito nas infecções por *L. interrogans* em cervídeos (Faine et al., 1999) e em muitas outras doenças, possuindo valor de diagnóstico quando associada às alterações hemolíticas (Faine et al., 1999) ou reprodutivas (Corrêa, 2007) decorrentes da doença.

Nos grupos de veado-campeiro com três ou mais indivíduos houve cerca de quatro vezes mais chances ($\text{OR} = 4,1053$) de positividade para a leptospirose quando comparados aos animais solitários ou que vivem em duplas (Tabela 4). Este resultado é bastante relevante, já que o veado-campeiro costuma formar os maiores e mais instáveis grupos no período reprodutivo, onde ocorrem disputas frequentes com alta rotatividade de indivíduos (Lacerda, 2008), podendo favorecer a disseminação venérea das leptospiras. Ainda o período reprodutivo destes cervídeos coincide com o regime de maior inundação do Pantanal (Lacerda, 2008) (Quadro 1), o que favorece a manutenção no ambiente de *Leptospira interrogans*, que podem infectar ativamente os hospedeiros.

QUADRO 1. Ciclo reprodutivo da fêmea de veado-campeiro no Pantanal associado às mudanças ambientais. As diferentes tonalidades de cinza indicam a intensidade com que um fenômeno ou comportamento ocorrem; quanto mais escuro, maior a proporção de registros para a variável.

Meses	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Chuva												
Inundação												
Cio												
Grupos												
Prenhez												
Nascimento												

Adaptado de Lacerda (2008)

As fêmeas adultas de veado-campeiro apresentaram 12 vezes ($\text{OR} = 12,3077$) mais chances de serem observadas com os seus filhotes saudáveis que as fêmeas sub-adultas primíparas (Tabela 5). A não observação dos filhotes, não significava que estes estavam mortos, pois a fêmea de veado-campeiro tem o comportamento de esconder sua cria recém nascida e se posicionar distante desta para confundir os predadores (Merino et al, 1997). Para mitigar o não avistamento dos filhotes por causas etológicas como a descrita acima, tomou-se o cuidado de monitorar uma mesma fêmea, em diferentes horários do dia e por vários dias consecutivos.

A maior proporção de fêmeas adultas acompanhadas de seus filhotes pode ter duas justificativas principais. A primeira está relacionada ao período de parição das

fêmeas adultas múltiparas que ocorre antes do início das chuvas (outubro e novembro) e da inundação do Pantanal, diferentemente das fêmeas sub-adultas primíparas, que por parirem mais tardiamente (dezembro, janeiro) podem ter menores chances de sobrevivência para os seus filhotes, devido à dispersão de predadores que acompanham os cursos d'água (jacarés) e da restrição do ambiente imposta pela inundação (Lacerda, 2008). A segunda justificativa que favorece as mães múltiparas está associada à imunidade gerada pela maior pré-exposição às *Leptospiras interrogans*, que favorece o desenvolvimento de anticorpos específicos e reativos para as sorovares presentes no ambiente (Alcérreca, 2006).

Os métodos sorológicos de diagnóstico demonstraram que a leptospirose é uma doença de considerável ocorrência na população de cervídeos estudada, embora o uso das técnicas moleculares não tenha indicado a infecção ativa nestes animais. A sorovar pomona teve a ocorrência mais frequente e apresentou os maiores títulos de aglutinação nos veados-campeiros. Esta sorovar ocorre em porcos-monteiros (forma feral de *Sus scrofa*) (Vieira, 2009), espécie exótica introduzida no Pantanal e que está amplamente distribuída na região (Mourão et al., 2002). Os resultados deste estudo fornecem indícios de que está havendo um processo de *spill over* (transbordamento) eco-epidemiológico da leptospirose natural do porco-monteiro para o veado-campeiro. As variáveis de risco identificadas poderão auxiliar em estudos futuros no entendimento das relações epidemiológicas existentes entre a infecção por *Leptospira interrogans*, as influências na reprodução do veado-campeiro e os fatores ambientais atuantes.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/UFMS, através de seus professores e funcionários; às equipes de pesquisa e desenvolvimento da Embrapa Pantanal e da Embrapa Gado de Corte; ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e aos proprietários e funcionários das fazendas localizadas na área deste estudo.

LITERATURA CITADA

- Alcérreca, M.A.A. 2006. Epidemiology and control of leptospirosis in farmed deer in New Zeland [tese] Palmerston North (Nova Zelândia): Massey University, Doutorado; 392 pp.
- Araújo, F. R., Ramos C.A.N., Luíz H.L., Schabib-Péres I.A.H.F., Oliveira R.H.M., Souza, I.I.F., Russi L.S. 2009. Avaliação de um Protocolo de Extração de DNA Genômico a Partir de Sangue Total. Comunicado Técnico 120, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 5 pp.
- Cheema P.S., Srivastava S.K., Amutha R., Singh H. e Sandey M. 2007. Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on *lipL21* and *lipL32* genes. Indian Journal of Experimental Biology (45) 568-573.
- Corrêa, S. H. R. 2007. Leptospirose. In: Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária. São Paulo, pp.736-741.
- Demaría M.R., McShea W. J., Koy K., Maceira N.O. 2003. Pampas deer conservation with respect to habitat loss and protected area considerations in San Luis, Argentina. Biological Conservation 115: 121–130
- Duarte, J.M.B. & Merino, M. L. 1997 Taxonomia e evolução. Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. Jaboticabal. p.1-22.
- Duarte J.M.B. 2007. Artyodactyla – Cervidae (Veado-catingueiro, Veado-campeiro, Cervo-do-pantanal). In: Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária. 1ª ed. Roca, São Paulo, p.641-664.
- Faine, S., Adler, B, Bolin, C.A., Perolat, P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. Med Science. Melbourne, 296 pp.
- Girio, R.J.S.; Pereira, F.L.G.; Marchiori Filho, M.; Mathias, L.A.; Herreira, R.C.P.; Alessi, A.C e Gírio, T.M.S. 2004. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres ou em estado feral da região da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. Ciência Rural, v. 34, p. 165-169.
- Godfroi, J. 2002. Brucellosis in wildlife. Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties, 21: 277-286.
- González S., Cosse M., Braga F.G., Vila A.R., Merino M.L., Dellafiore C., Cartes J.L., Maffey L., Dixon M.G. 2010a. Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus 1758 In: Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer FUNEP/IUCN São Paulo pp. 119-132.
- González S., Duarte J.M.B e Maldonado J.E. 2010b. Molecular phylogenetics and evolution. Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer FUNEP/IUCN, São Paulo pp. 12-17
- Lacerda A.C.R. 2008. Ecologia e estrutura social do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal [tese] Brasília (DF): UnB, Doutorado; 194 pp.
- Le Febvre R.B. 2003. Leptospiras. In: Microbiologia Veterinária, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 174-178.
- Lemos, R.A.A., Almeida, A.P.M. G. 2005. Leptospirose Bovina. In. Leptospirose Bovina, Campilobacteriose Genital Bovina, Tricomonose Bovina e Neosporose em Bovinos – Série Qualificação Rural Ed. UFMS, Campo Grande, MS, p. 9-21.
- Levett P. N. 2001. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. 14(2):296–326.
- Mackintosh C., Haigh J.C., Griffin F. 2002. Bacterial diseases of farmed deer and bison. Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties. 21(2):249-263.

- Mathias L.A., Girio R.J.S. & Duarte J.M.B. 1999. Serosurvey For Antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 35(1):112-114.
- Mérien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I., 1992. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2219-2224.
- Merino, M. L., Gonzales, S., Leeuwenberg, F. Rodrigues, F.H.G., Pinder, L. e Tomas, W.M. 1997. Veadocampeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. Jaboticabal. FUNEP. pp. 42-58.
- Mörner T., Obendorf D.L. Artois M. Woodford M. H. 2002 Surveillance and monitoring of wildlife diseases *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*. 21 (1), 67-76.
- Mourão, G.M., Coutinho, M.E., Mauro, R.A., Tomás, W.M., Magnusson, W. 2002. Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco-monteiro), gado bovino e búfalo. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 28, Corumbá, MS, 21 pp.
- Pellegrin A.O., Guimarães P.H.S., Sereno J.R.B., Figueiredo J.P., Lage A.P., Moreira E.C., Leite R.C. 1999 Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. *Comunicado Técnico* 22, Embrapa Pantanal, Corumbá 9 pp.
- Santos S.A. 2002. Aspectos Agro e Zoológicos. *In: Sistema de produção de gado de corte do Pantanal*, Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) pp 14-17.
- Tiepolo L.M. & Tomas W.M. 2006. Ordem Artiodactyla. *Mamíferos do Brasil*. Sema, Londrina, p.268-288.
- Van Eys G.J.J.M., Gerritsen T.M.J., Korver H., Schoone G.J., Kroon C.C.M, e Terpstra W.J. 1991 Characterization of Serovars of the Genus *Leptospira* by DNA Hybridization with *Hardjobovis* and *Icterohaemorrhagiae* Recombinant Probes with Special Attention to Serogroup Sejroe. *Journal of clinical microbiology*, 29, n. 5 pp. 1042-1048
- Vieira A.S. 2009. Levantamento de *Leptospira* spp. em animais silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares [dissertação] Campo Grande (MS): UFMS, Mestrado; 83 pp.
- WHO 2003. Human leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and control. World Health Organization 122 p
- Wobeser, G. 2002. Disease management strategies for wildlife. *Revue Scientifique et Technique de le Office International des Epizooties*, 21:159-178.
- Wobeser, G. A. 2006. *Essentials of Disease in Wild Animals*. Blackwell Publishing, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 243 pp.