

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL**  
**CAMPOS DE PATOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEPTOSPIROSE E BRUCELOSE**  
**BOVINA EM PROPRIEDADES RURAIS DE AGRICULTURA FAMILIAR DO**  
**AGRESTE PARAIBANO, NORDESTE DO BRASIL**

**ROBÉRIO MACÊDO DE OLIVEIRA**

**PATOS-PB**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL**  
**CAMPOS DE PATOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEPTOSPIROSE E BRUCELOSE**  
**BOVINA EM PROPRIEDADES RURAIS DE AGRICULTURA FAMILIAR DO**  
**AGRESTE PARAIBANO, NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

**ROBÉRIO MACÊDO DE OLIVEIRA**

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

**Orientador**

**PATOS-PB**

**2012**

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CAMPUS DE PATOS

O48i

2012

Oliveira, Robério Macêdo de

Inquérito soroepidemiológico para leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar do agreste paraibano, nordeste do Brasil/ Robério Macêdo de Oliveira. - Patos: CSTR/PPGMV, 2012.

67 p.

Inclui bibliografia.

Orientador (a): Sérgio Santos de Azevedo

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Medicina Preventiva – Dissertação. 2 – Doenças infectocontagiosas 3 - Bovino - 4 – Leptospirose. 5 – Brucelose. I – Título.

CDU: 614 (043.3)

## **FICHA DE AVALIAÇÃO**

Nome: OLIVEIRA, Robério Macêdo

Título: Inquérito soroepidemiológico para leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar do agreste paraibano, Nordeste do Brasil

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo - UFCG**

**Orientador**

---

**Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto -UFERSA**

**Primeiro Membro**

---

**Prof. Dr. Edísio Oliveira de Azevedo - UFCG**

**Segundo Membro**

Ao Senhor Deus, por esta  
sempre ao meu lado e por ter  
me dando forças para eu chegar  
até aqui.

Dedico

À minha esposa Meire Macêdo  
por ter colaborado no trabalho e  
por ter me dado, carinho e amor  
nas horas que mais precisei.

Dedico

Ao meu irmão que é meu anjo da guarda Leonel do Carmo de Oliveira Neto “*in memorim*”, por esta sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis e nos momentos alegres da minha vida.

Dedico

“Se chorei ou se sorri o importante é  
que emoções eu vivi”.

(Roberto Carlos)

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, por ter me dado força e saúde, por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis e me ajudado a levantar a cabeça, seguir em rente e vencer. Agradeço as oportunidades de aprendizado e sabedoria que sempre encontrei em suas palavras bíblicas, o que fez de me um homem de fé e de muita prudência.

À minha esposa, Meire Macêdo pela Paciência, lealdade e companheirismo e por ser o grande alicerce na minha vida.

Aos meus pais, Rubens Macêdo e Luza Macêdo, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiando financeiramente.

Ao meu irmão, Leonel do Carmo de Oliveira Neto “*in memoriam*”, por me guiar a seguir os caminhos certos.

Aos meus avós paternos, Leonel do Carmo e Judith “*in memoriam*”.

Aos meus avós maternos, Luis Lucena “*in memoriam*” e Lourdes Calvacanti minha linda rosa.

Ao meu orientador, professor Dr. Sérgio Santos de Azevedo por sua dedicação, ensinamentos e paciência.

Aos professores, Edísio Oliveira de Azevedo e Sidnei Miyoshi por aceitarem o meu convite para serem meus examinadores a quem tenho admiração pelas suas coerências e ética profissional.

Aos meus amigos, Silvano, Gildenor, que me ajudaram durante o Mestrado quando precisei, a Roberto, Carlos, Gilbraz e Pedro pelas horas de descontração durante esses dois anos;

Às minhas amigas, Marizete, Divanilda e Wigna pelas palavras de carinho.

Ao meu Diretor, professor e grande amigo Paulo de Melo Bastos, a sua esposa Jaqueline pelas palavras amigas e ao seu querido, filho Paulo de Melo Bastos Filho pelas horas de descontrações e brincadeiras.

Aos meus sogros, Antônio Gustavo e Maria Alvaro pelo apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos, Victor e Higor e as minhas sobrinhas, Daiane, Thais e Ellen pela descontração de nossas brincadeiras.

Ao funcionário Jonas da pós-graduação de Medicina Veterinária, por sempre me ajudar nas burocracias durante o mestrado e pela sua amizade de sempre.

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT) no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR).

## SUMÁRIO

	Pag.
<b>LISTA DE FIGURA</b>	
<b>LISTA DE QUADRO</b>	
<b>CAPÍTULO I – Revisão de Literatura: Leptospirose e Brucelose Bovina.....</b>	<b>13</b>
<b>COSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>13</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>1. LEPTOSPIROSE BOVINA .....</b>	<b>14</b>
1.1 ETIOLOGIA.....	14
1.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....	15
1.3 PATOGENIA .....	15
1.4 HOSPEDEIROS .....	16
1.5 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES.....	17
1.6 DIAGNÓSTICO.....	18
1.7 TRANSMISSÃO.....	20
1.8 PREVENÇÃO E CONTROLE .....	20
<b>2. BRUCELOSE .....</b>	<b>22</b>
2.1 ETIOLOGIA.....	22
2.2 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA E ECONÔMICA .....	22
2.3 PATOGENIA .....	24
2.4 HOSPEDEIROS .....	24
2.5 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES.....	25
2.6 DIAGNÓSTICO.....	26
2.7 TRANSMISSÃO.....	27
2.8 PREVENÇÃO E CONTROLE .....	29
2.9 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA NO BRASIL.....	30
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO II – Soroepidemiologia da leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar do Agreste paraibano, Nordeste do Brasil.....</b>	<b>40</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>41</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>41</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo II

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Estado da Paraíba demonstrando os municípios e respectivos números de propriedades rurais utilizadas, na mesorregião do Agreste paraibano-----	50

## LISTA DE QUADROS

### Capítulo II

	Pág.
<b>Quadro 1.</b> Frequência de leptospirose bovina por propriedade de agricultura familiar e por animal no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011-----	50
<b>Quadro 2.</b> Frequência de leptospirose bovina por propriedade de agricultura familiar e por animal no Agreste paraibano, segundo o sorovar reagente, no período de julho a agosto de 2011-----	50
<b>Quadro 3.</b> Frequência de brucelose bovina por propriedade de agricultura familiar e por animal no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011-----	50
<b>Quadro 4.</b> Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para leptospirose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011-----	51
<b>Quadro 5.</b> Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011-----	53
<b>Quadro 6.</b> Fator de risco para brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011-----	54

**CAPÍTULO I**  
**LEPTOSPIROSE E BRUCELOSE BOVINA**  
**(Revisão de Literatura)**

## **COSIDERAÇÕES INICIAIS**

O presente trabalho foi elaborado visando cumprir as exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande. Este trabalho é composto por dois capítulos.

O primeiro capítulo trata-se de uma revisão de literatura acerca dos principais aspectos referente à leptospirose e brucelose em bovinos. Foram pesquisados livros, artigos científicos, notas técnicas, teses, dissertações, anais de congressos, dentre outros, buscado em bases de dados como: Google, PubMed, Scielo, LILACS. Os termos pesquisados foram: leptospirose, *Leptospira* spp., brucelose, *Brucella abortus*, bovinos, zoonose, sorologia, fatores de risco. Foram levantados os principais aspectos e perspectivas dessas importantes doenças que afetam a bovinocultura mundial, bem como desperta atenção das autoridades de Saúde Pública, devido seu caráter zoonótico.

No segundo capítulo são discutidos os resultados obtidos em inquérito epidemiológico em bovinos de propriedades rurais de agricultura familiar do Agreste paraibano. Onde os agricultores dessas propriedades têm sua renda gerada pela atividade agrícola e a base da força de trabalho utilizada na propriedade é desenvolvida por membros da família. Nesses animais foram colhidas amostras de sangue para realização de exames sorológicos, cujos resultados determinaram a condição, por propriedade, de positiva ou negativa, que foram comparadas em relação à algumas variáveis para a determinação de fatores de risco para ambas as infecções. Os resultados foram editados na forma de artigo científico, de acordo com as normas do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira, para o qual será submetido para publicação, atendendo também às exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande para obtenção do título de mestre em medicina veterinária.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 LEPTOSPIROSE BOVINA

#### 1.1 ETIOLOGIA

As leptospiras são microrganismos helicoidais, muito finos (0,1µm de diâmetro) com comprimento de 6 a 20 µm, aeróbios estritos, que apresentam uma ou ambas as extremidades encurvadas ou em forma de gancho, dotados de grande motilidade. Crescem muito bem em temperaturas de 28 a 30°C, possuem multiplicação e crescimento lentos e são exigentes no que se refere a meios nutritivos (HANSON, 1982). Dois flagelos periplasmáticos (fibrila axial e endoflagelo) ocorrem em cada célula onde está inserido em cada extremidade e raramente se sobrepõe na região central. Sua multiplicação é por fissão transversa. Movimentam-se ativamente, através de rotações e flexões ao longo de seu próprio eixo (FAINE et al.,1999).

Anteriormente, o gênero *Leptospira* estava dividido em duas espécies, de acordo com critérios antigênicos: *Leptospira interrogans*, da qual faziam parte todas as cepas patogênicas, e *L. biflexa*, contendo cepas saprófitas isoladas do ambiente. Estudos taxonômicos recentes, baseados na homologia do DNA, permitiram a reclassificação do agente em 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*, com mais de 260 sorovares; e as genomoespécies saprófitas incluem: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii*, que englobam mais de 60 sorovares (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

## **1.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

É bastante conhecido o impacto da leptospirose na esfera reprodutiva em animais de produção. Nesses animais, a leptospirose causa transtornos na esfera reprodutiva, que levam à diminuição da produtividade (THRUSFIELD, 1986). Em bovinos, a leptospirose causa abortamentos, natimortalidade e infertilidade, sendo estes, na maioria das vezes, os únicos e expressivos sinais da doença no rebanho. (FAINE et al., 1999).

O sorovar Hardjo tem sido apontado como causador de abortamento e infertilidade em rebanhos bovinos de leite (PRESCOTT et al., 1988, DHALIWAL et al., 1996a, DHALIWAL et al., 1996b). A comparação da performance reprodutiva entre vacas de leite reagentes e não reagentes ao sorovar Hardjo foi efetuado por GUITIAN et al. (1999), que encontraram diferença estatisticamente significativas, tais como redução da fertilidade do grupo infectado devida a um maior intervalo entre parto e concepção e maior número de coberturas por concepção.

A mortalidade embrionária e fetal afeta de forma significativa os índices reprodutivos dos rebanhos bovinos (PITUCO; DEL FAVA, 2003). No Brasil, em bovinos leiteiros, foram obtidos isolamentos de leptospira em fetos abortados por Genovez et al. (1993) e Langoni et al. (1999).

## **1.3 PATOGENIA**

A penetração do agente no organismo susceptível ocorre pelas mucosas, pele escarificada e mesmo integra. Vencidas as barreiras da porta de entrada, as leptospiras multiplicam-se no espaço intersticial e nos humores orgânicos (sangue, linfa e liquor), caracterizando um quadro agudo septicêmico denominado de leptospiremia (MYERS, 1985). As lesões primárias são atribuídas à ação mecânica do microrganismo nas células endoteliais de revestimento vascular.

A consequência direta das lesões dos pequenos vasos é o derrame sanguíneo para os tecidos (hemorragias), a formação de trombos e o bloqueio do aporte sanguíneo nas áreas acometidas na fase aguda da infecção (BRASIL, 1995).

A fase de leptospiremia cessa quando anticorpos opsonizantes surgem na circulação, aproximadamente dez dias após o início da infecção, promovendo a eliminação de leptospiras da corrente sanguínea e da maioria dos órgãos acometidos. Entretanto, leptospiras localizadas em locais protegidos do sistema imune, como rim e trato genital, podem persistir por períodos prolongados. A persistência de leptospiras no rim pode ocasionar desde pequenos infiltrados inflamatórios focais a extensas lesões, caracterizadas por necrose celular, atrofia tubular e hemorragia renal, seguida de cicatrização e localização de leptospiras na superfície luminal das células tubulares (FAINE, 1982). A ausência de fagócitos na urina permite a multiplicação destes microrganismos nos túbulos contornados renais formando microcolônias. Desta localização as leptospiras passam a ser eliminadas na urina (leptospiúria) por períodos variáveis entre dias a anos. Tal fato explica a existência de portadores renais, fator primordial na epidemiologia da leptospirose, onde a transmissão ocorre pela exposição à urina de animais infectados ou ambientes contaminados pela mesma (PLANK; DEAN, 2000; ACHA; SZYFRES, 2001).

#### **1.4 HOSPEDEIROS**

A leptospirose é uma antropozoonose e, portanto, os animais são hospedeiros primários, essenciais para a persistência dos focos da infecção. Os seres humanos são hospedeiros acidentais, terminais, pouco eficientes na perpetuação da infecção (BRASIL, 1995).

Apesar das leptospiras não possuírem hospedeiros específicos para as diversas variantes sorológicas, observa-se a existência de hospedeiros preferenciais, que se comportam como reservatórios, sendo estes os principais responsáveis pela persistência da infecção em diferentes ecossistemas (VASCONCELLOS, 1987; LEVET, 1999). No Brasil, as associações mais frequentes entre as espécies hospedeiras e respectivos sorovares tem sido: suínos (*Pomona*, *Tarassovi*, *Bratislava* e *Icterohaemorrhagiae*);

bovinos (Hebdomadis, Hardjo e Wolffi; equinos (Icterohaemorrhagiae, Canicola e Pomona); cães (Canicola e Icterohaemorrhagiae); ovinos e caprinos (Hardjo e Icterohaemorrhagiae) (BRASIL, 1995; FÁVERO et al., 2002).

## 1.5 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

Os sinais clínicos da infecção de bovinos são variados e dependem do sorovar infectante. A doença pode ocorrer nas formas aguda e crônica. Na forma aguda, ocorrem sinais de febre, hemoglobinúria, icterícia, anorexia, aborto e queda na produção do leite devido a uma mastite atípica, com o úbere podendo apresentar-se edematoso e flácido à palpação, com o leite apresentando-se amarelado ou sanguinolento, sinais clássicos da infecção pela sorovariabilidade Hardjo. Na forma crônica, as alterações estão restritas à esfera reprodutiva, mais associadas aos sorovares Hardjo e Pomona, culminando em abortos, geralmente no terço final de gestação, retenção de placenta, infertilidade, natimortos e morte fetal (BOLIN & ALT, 1999 ; RIET-CORREA et al. 2001).

A doença nos bezerros é de maior gravidade que nos animais adultos. Aqueles afetados pela forma septicêmica são encontrados mortos ou com profunda depressão e hipertermia, morrendo em um período de cinco a 12 horas. Em alguns animais o curso clínico é de até 24 horas. Observa-se profunda anemia, hemoglobinúria e icterícia. O sangue aparece de coloração achocolatada, aquoso, não coagula e não é observada sedimentação de eritrócitos. Mesmo quando tratados na fase inicial da enfermidade os bezerros acometidos raramente sobrevivem (BROD & FEHLBRG, 1992).

Nos achados de necropsia, pode-se observar úlceras e hemorragias na mucosa do abomaso e se a hemoglobinúria for grave, edema pulmonar e enfisema podem estar associados. Histopatologicamente há nefrite intersticial difusa e necrose hepática centrolobular e, em alguns casos, lesões vasculares nas meninges cerebrais. Os fetos bovinos abortados geralmente estão autolisados. Entretanto estes achados não são patognomônicos (CORRÊA e CORRÊA, 1992; FAINE et al., 1999).

A maioria dos fetos abortados apresenta avançado grau de autólise, sem que se observem alterações específicas. Animais nascidos fracos ou natimortos podem apresentar icterícia, fígado pálido ou amarelado, ou rins edemaciados com manchas esbranquiçadas na superfície. Na histologia, quando não há autólise avançada, podem ser observadas leptospiras nos rins. Na placenta pode haver placentite com edema e áreas de necrose (RIET-CORREA et al. 2001).

## 1.6 DIAGNÓSTICO

Devido à grande diversidade de sinais clínicos, o diagnóstico da leptospirose pode ser confirmado por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção de anticorpos, na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético da bactéria na urina ou nos tecidos (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001, BHARTI et al., 2003;).

O exame direto em microscopia de campo escuro pode ser utilizado no diagnóstico. Neste as leptospiras podem ser demonstradas no sangue na fase aguda da doença, entretanto, um resultado negativo não significa a ausência da enfermidade. O sangue deve ser colhido desfibrinado e imediatamente examinado ao microscópio de campo escuro entre lâmina e lamínula. Pode-se utilizar também o líquor e mais comumente a urina, só que nesta as leptospiras estarão presentes mais tardiamente, a partir do 15º dia da doença. No entanto, esta prática requer técnicos capacitados, pois outros microrganismos podem ser confundidos com as leptospiras (LANGONI, 1996).

A cultura para isolamento do agente e a inoculação em hamsters (*Mesocricetus auratus*) são técnicas mais eficientes e seguras de diagnóstico. Os meios mais utilizados para isolamento das leptospiras são os de Fletcher (enriquecido com soro de coelho a 10%) e o EMJH (com albumina e Tween 80). Pode-se cultivar sangue, líquor ou urina, conteúdo estomacal de fetos abortados, conteúdo de rins, fígado e baço. As culturas devem ser realizadas imediatamente após o recebimento da amostra (LILENBAUM, 1996).

Deve-se ressaltar que o isolamento de leptospiras é extremamente difícil, e na maioria das vezes infrutífero. A partir do leite a dificuldade ainda é maior pela presença

de substâncias leptospiricidas, como ácidos graxos insaturados, e o rápido surgimento de anticorpos no soro do leite, sendo necessário o seu cultivo imediato após a coleta (THIERMANN, 1982).

No diagnóstico sorológico, os testes de macroaglutinação e microaglutinação, são os mais comumente utilizados, devendo-se avaliar amostras de pelo menos 10% do rebanho (Bolin & Alt, 1999). A reação de macroaglutinação é considerada gênero específico, e deve ser utilizada como prova de triagem. Os antígenos empregados constam de suspensão concentrada de leptospiras inativadas pelo formol e podem ser adquiridos em *kits* comerciais. No entanto, esta prova apresenta algumas desvantagens, como o aparecimento frequente de resultados falso negativos e com menor frequência de falso positivos. Segundo o fabricante o teste reage melhor contra soros colhidos na fase aguda da doença (LANGONI, 1996).

A reação de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos continua sendo a técnica de referência para o diagnóstico da leptospirose. Neste teste é relativamente comum observar fenômenos de co-aglutinação, ou seja, a presença de anticorpos contra mais de um sorovar de leptospira, e neste caso, na interpretação dos resultados, o sorovar mais provável é aquele com título mais alto. Os antígenos utilizados são culturas de cepas-padrão de leptospiras, mantidas por repiques semanais em meio de EMJH. Quaisquer outras cepas poderão ser incluídas na bateria de antígenos, desde que representem situação epidemiológica local (LANGONI, 1996; FAINE et al., 1999).

A interpretação dos resultados sorológicos é complexa por vários fatores: reação cruzada de anticorpos, títulos de anticorpos induzidos por vacinação e a falta de consenso sobre que títulos de anticorpos são indicativos de infecção ativa. Normalmente títulos de anticorpos > 100 são indicativos de infecção. Em resposta à vacinação, no geral o rebanho desenvolve baixos títulos de anticorpos aglutinantes (100 a 400) e estes persistem por um a seis meses (BOLIN & ALT, 1999; NARDI JÚNIOR, 2007).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) vem sendo utilizada de forma crescente para o diagnóstico da leptospirose no ser humano e em várias espécies animais. Lilenbaum et al. (2008) utilizaram a PCR para detectar leptospiras em sêmen e fluido vaginal, encontrando DNA desse agente em amostras provenientes de animais soropositivos. Lilenbaum et al. (2009), estudando amostras de urina de ovinos naturalmente infectados com *Leptospira interrogans* detectaram DNA de leptospira em seis amostras de urina.

## 1.7 TRANSMISSÃO

A transmissão da leptospirose pode ocorrer pelo contato direto da pele, das mucosas oral e conjuntival, com a urina e órgãos de animais portadores de leptospiros. As vias transplacentária e mamária podem ser também consideradas na transmissão da leptospirose (GUIMARÃES et.al., 1983).

A via venérea, pela monta natural realizada entre animais infectados, é uma das mais importantes condições para a transmissão direta. A possibilidade de transmissão da leptospirose pelo sêmen industrializado é minimizada, desde que os critérios preconizados pela OIE (*World Organization for Animal Health*) em relação à saúde do touro doador e a manipulação do ejaculado sejam seguidas. Entretanto, no sêmen industrializado proveniente de touro infectado, há a possibilidade de transmissão da leptospirose apesar de acrescido do extensor com antibióticos, sendo dependente da dose infectante e da sensibilidade da estirpe de *Leptospira* spp. ao protocolo antibiótico empregado, uma vez que o glicerol e o armazenamento em nitrogênio líquido permitem a conservação da bactéria (VASCONCELLOS, 1996; COSTA et al., 1998; RADOSTITS et al., 2000;).

Nas criações, a disseminação da leptospira é caracterizada pela presença de animais doentes ou portadores assintomáticos que eliminam o agente pela urina e descargas cérvico-vaginais, além dos fetos abortados e placenta, mantendo a doença endêmica na propriedade. As leptospiros que são eliminadas na urina de animais infectados persistem no meio ambiente por tempo variável de acordo com as condições de umidade, temperatura e pH (FAINE et al., 1999).

## 1.8 PREVENÇÃO E CONTROLE

O controle da leptospirose animal deve assentar-se na integração de medidas profiláticas instituídas simultaneamente nos três níveis da cadeia de transmissão: fontes de infecção (vertebrados infectados), vias de transmissão (água, solo e fômites

contaminados) e susceptíveis (vertebrados não infectados e não imunizados) (GUIMARÃES et al., 1982, 1983 FAINE et al., 1999 ).

Em relação às fontes de infecção, representadas principalmente pelos hospedeiro sinantrópicos (roedores), todos os esforços devem ser concentrados na aplicação de medidas de saneamento do meio que incluem: destino adequado do lixo, armazenagem correta dos alimentos para consumo humano e animal em instalações construídas a prova dos roedores, evitar ao máximo a armazenagem de entulhos ou qualquer tipo de objeto em desuso que possa fornecer abrigo para tais animais e finalmente a aplicação dos métodos ofensivos, representados pelo uso racional dos diversos tipos de rodenticidas. Quanto às fontes de infecção constituídas pelos animais domésticos, as medidas preventivas assentam-se no diagnóstico precoce e na instituição do tratamento específico (BRASIL, 1995).

Em relação às vias de transmissão, especial cuidado deve ser tomado no sentido de eliminar-se o excesso de água livre, com o emprego de técnicas de drenagem e canalização dos cursos de água. O destino adequado dos esgotos e das águas servidas é de grande importância para a redução do nível de contaminação ambiental (BRASIL, 1995).

A vacinação de animais susceptíveis é a principal forma de prevenção de leptospirose (FAINE et al., 1999). Geralmente são utilizadas vacinas inativadas que contenham os sorovares de leptospiras presentes na região (SALLES; LILENBAUM, 2006). No entanto, as vacinas são sorovares-específicas, não protegendo os animais vacinados em caso de exposição a sorovares que não estejam contidos na vacina (FAINE et al., 1999). Para bovinos, no Brasil, as vacinas anti-leptospirose são compostas basicamente pelos sorovares Pomona, Hardjo, Wolffi, Canicola, Grippotyphosa e Icterohemorrhagiae.

Sullivan (1974) relatou que vacinação de vacas gestantes assegura transferência de imunidade colostrálica para as crias que, por sua vez, estarão imunes até os três meses de idade. Faine (1982) sugeriu que a imunização devia ser feita durante os dois últimos terços da gestação. Novilhas de mães vacinadas tardiamente ganham imunidade por alguns meses, porém devem ser imunizadas com três a cinco meses de idade, visando assegurar maior proteção contra a doença.

## **2 BRUCELOSE**

### **2.1 ETIOLOGIA**

A bactéria causadora da brucelose bovina, a *Brucella abortus*, pertence ao gênero *Brucella*. Além dela, existem outras espécies associadas a outros hospedeiros: *Brucella suis* (suínos), *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos) e *B. neotomae* (roedores). Recentemente, vários estudos confirmaram o isolamento e identificação de novas espécies. Foster et al. (2007) isolaram e identificaram *B. ceti* em mamíferos marinhos (baleias e golfinhos). Cloeckaert et al. (2001) isolou de mamíferos marinhos (focas, morsas e leões marinhos) a *B. pinnipedialis*. Hubalek et al. (2007), a partir de ratazanas na República Tcheca, identificaram uma nova espécie denominada *B. microti*. Scholz et al. (2010) isolaram uma espécie (*B. inopinata*) a partir de prótese de seio em ser humano.

As brucelas são bactérias intracelulares facultativas, Gram-negativas, que podem infectar muitas espécies animais e inclusive o homem. São cocobacilos curtos, pequenos e pleomórficos, não formam cápsulas ou esporos e nem se movimentam ativamente (RIEMANN, 2006; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; CHU & WEYANT, 2003).

Apesar de permanecerem no ambiente, as bactérias não se multiplicam; elas são medianamente sensíveis aos fatores ambientais. Resistem às condições do meio ambiente desde que protegidas por matéria orgânica, como restos placentários, produtos de aborto e fezes. Em esterqueira são rapidamente destruídas pela acidez (ALTON et al. 1975, BRASIL 2003, PAULIN & FERREIRA NETO 2003).

### **2.2 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA E ECONÔMICA**

Nos seres humanos, a brucelose é uma antropozoonose de caráter principalmente ocupacional, e os indivíduos mais expostos são os que trabalham diretamente com os

animais infectados (tratadores, proprietários, veterinários) ou com produtos de origem animal (magarefes, laboratoristas) (COSTA, 2001; DOGANAY; AYGEM, 2003). No homem, o período de incubação da brucelose varia de uma a cinco semanas, no entanto, pode prolongar-se por meses, e a doença é septicêmica de início repentino ou insidioso. Na fase aguda, os principais sinais clínicos são febre contínua ou intermitente, calafrios, dores musculares e abdominais, artrite, insônia, cefaléia, sudorese profusa e mal-estar; na fase crônica, é freqüente o comprometimento neuropsíquico, com irritabilidade, nervosismo e depressão. As principais complicações incluem endocardite, miocardite, pericardite, meningite, artrite, hepatite e abscessos viscerais (HARTIGAN, 1997; DOGANAY; AYGEM, 2003). Os seres humanos adquirem a brucelose por contato direto com animais infectados, ou indiretamente, pela ingestão de produtos de origem animal, principalmente leite cru. A transmissão por aerossóis também foi observada (DOGANAY; AYGEM, 2003).

Em termo de perdas econômicas nos bovinos e bubalinos, a brucelose acomete de modo especial, o trato reprodutivo, gerando perdas diretas devido, principalmente, a abortos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção de leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas. Nas propriedades onde a doença está presente, o valor comercial de seus animais fica depreciado; as regiões onde a doença é endêmica encontram-se em posição desvantajosa na disputa de novos mercados (BRASIL, 2005).

Estimativas mostram que a brucelose é responsável pela diminuição de 20% a 25% na produção de leite, 10% a 15% na produção de carne e 15% de perda de bezerros em decorrência de abortamentos. Mostram ainda que, em cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril (BRASIL, 2005).

Dentro das perdas indiretas, deve-se salientar as que resultam em infecções humanas. Na maioria das vezes, quando a enfermidade não é tratada, o curso crônico da doença no homem produz perdas econômicas importantes. Essas perdas estão relacionadas com os custos do diagnóstico e tratamento, muitas vezes requerendo internações prolongadas. Além disso, saliente-se o custo do período decorrente da ausência ao trabalho (BRASIL, 2005).

## 2.3 PATOGENIA

As principais portas de entrada da *B. abortus* são as mucosas oral, nasal, genital e ocular. Após a penetração na mucosa, as bactérias são fagocitadas, multiplicam-se nos linfonodos regionais e a partir daí poderão disseminar-se pela via hemática e linfática, albergando-se nos tecidos ricos em células mononucleares fagocitárias, podendo sobreviver por longos períodos dentro dos fagócitos, escapando assim da resposta imune (LAGE, 2006).

A bactéria dissemina-se pelos vasos linfáticos e se desloca pelos órgãos através da corrente sanguínea, instalando-se preferencialmente em baço, linfonodos, fígado, aparelho reprodutor masculino, úbere e útero. As brucelas tendem a se multiplicar no útero de fêmeas suscetíveis, onde seu crescimento é favorecido pela presença da substância eritritol, produzido no feto e nas membranas circundantes. As lesões necrótico-inflamatórias placentárias impedem a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, provocando, assim, o aborto (TORTORA, 2000; LAGE, 2006). Em geral o aborto se dá na segunda metade da prenhez, causando retenção placentária ou metrites que podem ser causas de infertilidade permanente em vacas (ACHA; SZYFRES, 2001). O eritritol é um álcool poli-hídrico de quatro carbonos produzidos a partir dos líquidos alantoideano e amniótico bovino (PEARCE et al., 1961). Já em touros, ocasionalmente a infecção localiza-se nos testículos, epidídimo ou vesícula seminal formando abscessos (IKRAM; HILL, 1991).

## 2.4 HOSPEDEIROS

Os bovinos são os hospedeiros preferenciais da *Brucella abortus*, no entanto, esta bactéria pode infectar outras espécies domésticas e silvestres. Entre os animais domésticos, além dos bovinos, podem ser infectados os equídeos, suínos, ovinos, caprinos, cães e bubalinos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Os equídeos são os animais menos susceptíveis à infecção e são tidos como hospedeiros terminais (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). A característica clínica marcante nos eqüinos é o abscesso localizado na cernelha ou bursite supra-atlantal ou supra-espinhosa (CRAWFORD; HUBER; ADAMS, 1990; RASHMIR-RAVEN et al., 1990).

A transmissão da *B. abortus* para os suínos não é freqüente, e quando ocorre, determina uma infecção transitória, no entanto, neste caso, os suínos podem ser fontes de infecção para bovinos (NICOLETTI, 1980; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A *B. abortus* apresenta baixa patogenicidade para caprinos e ovinos, contudo já foi isolada destes animais em várias ocasiões (BANNATYNE, 1960; LUCHSINGER; ANDERSON, 1979; SHAW, 1976).

A infecção por *B. abortus* em cães é de ocorrência esporádica e geralmente resulta do contato de animais da zona rural com produtos de origem animal contaminados ou da ingestão de restos de abortamentos brucélicos (BARR et al., 1986; FORBES, 1990). A importância dos cães na epidemiologia da brucelose bovina tem sido apontada como indireta (FORBES, 1990; NICOLETTI, 1980), uma vez que os mesmos podem carrear produtos de abortamentos pelas pastagens e até mesmo entre fazendas (VASCONCELLOS; ITO; CÔRTEZ, 1987).

Nos bubalinos, a brucelose apresenta as mesmas características que nos bovinos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

## **2.5 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES**

Os sinais clínicos predominantes em vacas gestantes é o abortamento, que ocorre em torno do sétimo mês de gestação. O abortamento ocorre com grande frequência na primeira gestação pós-infecção, mas em decorrência do desenvolvimento de imunidade celular, é pouco frequente em uma segunda, e muito raro nas subsequentes (AZEVEDO, 2006).

As fêmeas infectadas apresentam placentite necrótica, usualmente com retenção de placenta que pode evoluir para metrite e infertilidade permanente. Nos machos, os

principais sítios de infecção são os testículos, vesículas seminais e epidídimo, nos quais ocorre inflamação, com aumento de volume uni ou bilateral dos epidídimos e testículos. Como consequência destas lesões, pode ocorrer subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (ACHA, SZYFRES, 2001; PAULIN, FERREIRE NETO, 2003; VASCONCELLOS, 1987).

## 2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico definitivo da brucelose é obtido através de exames laboratoriais diretos ou indiretos, com o objetivo de identificar os animais infectados e que estejam potencialmente eliminando o microrganismo e disseminando a doença. A maioria dos animais infectados é identificada utilizando testes sorológicos padrões, mas a infecção latente ocorre em alguns animais sorologicamente negativos. Além disso, os animais vacinados podem ser sorologicamente positivos e não-infectados, e títulos transitórios ocorrem esporadicamente em uma pequena porcentagem de animais para os quais não há uma explicação clara. Esses problemas diagnósticos tornam complicadas as explicações aos proprietários dos animais, e os programas de controle e erradicação de difícil aplicação (RADOSTITS et al., 2002).

No diagnóstico direto é feito o exame bacteriológico, executado a partir de espécimes suspeitos semeados em meios de cultura especiais. Uma vez isolada a brucela, é identificado o gênero através de estudos das características culturais, tintoriais, morfológicas e bioquímicas. Em meio sólido e em condições ideais, as colônias não são observadas até três a cinco dias de incubação, utilizando-se, portanto, incubação de 21 dias. As colônias se apresentam pequenas, translúcidas, brilhantes, convexas, de bordos arredondados e bem definidos e, geralmente, de coloração leitosa. O diagnóstico direto também pode ser realizado por meio da técnica de PCR, onde se detecta um filamento específico do DNA bacteriano presente nas amostras analisadas (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

Na ausência de uma cultura positiva para *B. abortus*, um diagnóstico normalmente é obtido com base na presença de anticorpos no soro, no leite ou no soro

do leite, no muco vaginal ou no plasma seminal (RADOSTITS et al., 2002). O sorodiagnóstico é a base para o combate à brucelose em rebanhos, permitindo o monitoramento tanto de propriedades como de regiões inteiras, além de vigiar zonas de onde a doença já foi erradicada. Todos os testes devem ser utilizados respeitando-se as normas técnicas estabelecidas (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

No Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2001, o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) foi preconizado como prova de triagem e, como provas confirmatórias, o 2-Mercaptoetanol (2-ME) e a reação de Fixação de Complemento (BRASIL, 2001).

## **2.7 TRANSMISSÃO**

Bovinos sexualmente maduros, especialmente vacas prenhes, são mais susceptíveis à infecção. Nestes animais, a infecção é usualmente crônica, com a persistência do agente no útero e nos linfonodos. Os touros também desempenham importante papel na transmissão da doença, pois elimina a bactéria pelo sêmen, o que não ocorre em novilhos e animais castrados (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

As principais vias de eliminação do agente são os fetos e seus envoltórios e as descargas uterinas no momento do parto ou em casos de abortamentos. Pelo fato destes materiais conterem uma grande quantidade de bactérias, há a contaminação de pastagens, água, alimentos e fômites. Dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, as brucelas podem permanecer viáveis no meio ambiente por longos períodos, o que amplia de forma significativa a chance de contato e infecção de hospedeiros susceptíveis (ACHA; SZYFRES, 2001; CRAWFORD; HUBER; ADAMS, 1990; NICOLETTI, 1980; QUINN et al., 2005).

O material fecal de bezerros que se alimentam de leite contaminado também pode contribuir para a contaminação ambiental, embora em menor grau, pois uma parte das bactérias é destruída no trato digestivo. No leite de vacas infectadas, as brucelas começam a ser eliminadas por volta de duas semanas após o parto ou abortamento e esta

condição pode persistir por vários meses (ACHA; SZYFRES, 2001; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A via de transmissão mais frequente é o contato indireto por ingestão de água, pasto e forragens contaminados. Outra forma de transmissão frequente é o contato direto, visto que as vacas costumam lambe membranas fetais, fetos abortados e bezerros recém-nascidos. O hábito das vacas lambe os órgãos genitais de outras vacas também possibilita a transmissão da doença (ACHA; SZYFRES, 2001).

Uma vaca pode adquirir a infecção apenas por cheirar fetos abortados, pois a bactéria também pode penetrar nos animais susceptíveis pelas mucosas do nariz e dos olhos. Nos bovinos, a transmissão pelo coito parece não ser de grande importância, pois na monta natural o sêmen é depositado na vagina, onde as defesas inespecíficas dificultam o processo de infecção. Na inseminação artificial com sêmen colhido de touros infectados a transmissão é possível, pois o sêmen é depositado diretamente no interior do útero, proporcionando a infecção da fêmea com pequenas quantidades do agente (ACHA; SZYFRES, 2001; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Ronald e Prabhakar (2001), em Tamil Nadu, Índia, isolaram *Brucella abortus* em cinco (3,7%) de um total de 136 amostras de sêmen congelado provenientes de três centros de inseminação artificial.

Na maioria das vezes, a doença aparece pela introdução de animais doentes em rebanhos livres da enfermidade, nos quais os animais não apresentam imunidade contra a brucelose. No início ocorre um elevado número de casos de aborto, que é reduzido após aproximadamente dois anos, quando as fêmeas doentes não mais abortam, embora continuem portadoras e produzindo bezerros fracos e pouco desenvolvidos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; ACHA & SZYFRES 2001).

Além da transmissão pelo leite aos seus bezerros, vacas brucélicas podem infectar seus produtos no útero, durante ou logo após o parto. Nesse caso, a infecção torna-se latente (portador latente). Esse fenômeno ocorre com frequência de 2,5% a 9% em condições naturais de campo, porém, apesar de não impedir o avanço dos programas de controle e erradicação, atrasa a eliminação do agente de uma população (BISHOP et al. 1994; BRASIL, 2003; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

## 2.8 PREVENÇÃO E CONTROLE

O controle da brucelose apóia-se basicamente em ações de vacinação massal de fêmeas e no diagnóstico e sacrifício dos animais positivos. São também muito importantes as medidas complementares, que visam diminuir a dose de desafio – caso ocorra a exposição – bem como é importante o controle de trânsito para os animais de reprodução. Programas de desinfecção e utilização de piquetes de parição são iniciativas simples que trazem como resultado a diminuição da quantidade de brucelas vivas presentes no ambiente. Isso representa diminuir a dose de desafio, o que, por sua vez, significa aumentar os índices de proteção da vacina e diminuir a chance de a bactéria infectar um novo suscetível (BRASIL, 2006).

As vacinas vivas atenuadas são aquelas que efetivamente foram e ainda são utilizadas nos programas de controle da brucelose. Duas delas, recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), são as mais empregadas: a B19 e a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes (amostra RB51). Ambas são boas indutoras de imunidade celular.

Com uma cobertura vacinal ao redor de 80%, ou seja, quando cerca de 80% das fêmeas em idade de procriar de uma população estiverem vacinadas, a frequência de animais infectados será bastante baixa. Portanto, uma redução importante da prevalência pode ser obtida utilizando apenas um bom programa de vacinação. Por essa razão, a vacinação deve ser priorizada nas fases iniciais do programa, quando as prevalências são elevadas (BRASIL, 2006; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

A eliminação das fontes de infecção, feita por meio de uma rotina de testes diagnósticos com sacrifício dos positivos, é a base das ações que visam criar propriedades livres da doença.

Em resumo, inicialmente deve-se baixar a prevalência com um bom programa de vacinação e, paulatinamente, ir aumentando as ações de diagnóstico para a obtenção de propriedades livres. Em regiões onde a frequência da doença é muito baixa, a implantação de eficientes sistemas de vigilância, adaptados à realidade local, pode ser de grande valia na descoberta de focos de brucelose. Assim sendo, os métodos de controle da brucelose são bastante simples. O mais importante é conhecer muito bem tanto a epidemiologia da doença, quanto a população em que as ações deverão ser desenvolvidas, e escolher a melhor estratégia para implementá-las (BRASIL, 2006).

## 2.9 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA NO BRASIL

A brucelose bovina está presente em todo o território brasileiro, porém, a sua prevalência e distribuição regional ainda não foram bem caracterizadas. A doença acomete os bovinos de corte e leite e também os bubalinos. Em 1975, foi realizado um diagnóstico de situação da doença no Brasil e a frequência de animais soropositivos foi estimada em 4,0% na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na Região Nordeste e 4,1% na Região Norte.

Com a instituição do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2001 (BRASIL 2001), foram planejados inquéritos sorológicos com o objetivo de determinar a situação epidemiológica da brucelose bovina nas Unidades Federativas e direcionar a escolha das estratégias de controle adequadas, que podem diferir de acordo com a frequência e a distribuição da doença. Até o momento, os inquéritos foram conduzidos em 15 estados, e as prevalências de animais soropositivos variaram de 0,06%, em Santa Catarina, a 10,2%, em Mato Grosso, e de propriedades positivas variaram de 0,32% no Estado de Santa Catarina a 41,5% no Estado do Mato Grosso do Sul (ALVES et al. 2009, AZEVEDO et al. 2009, CHATE et al. 2009, DIAS et al. 2009a, DIAS et al. 2009b, GONÇALVES et al. 2009a, GONÇALVES et al. 2009b, KLEIN-GUNNEWIEK et al. 2009, MARVULO et al. 2009, NEGREIROS et al. 2009, OGATA et al. 2009, ROCHA et al. 2009, SIKUSAWA et al. 2009, SILVA et al. 2009, VILLAR et al. 2009).

### 3REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud/Oficina Sanitária Panamericana/Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, v. 1, p.398,2001.

ADLER,B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-296, 2010.

ALVES, A.J.S., Gonçalves V.S.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Bahiense L., Amaku M., Ferreira F., Ferreira Neto J.S. & Dias R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:6-13.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. **Laboratory technique in brucellosis**.2 ed. Geneva: World Health Organization,p.175,1975.

ARAÚJO, V. E. M.; MOREIRA, E. C.; NAVEDA, L. A. B; SILVA, A.; CONTRERAS, R. L.Freqüência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.4, p.430-435, 2005.

AZEVEDO, S. S. **Caracterização Epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo**. Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária. São Paulo, 2006.

AZEVEDO, S.S., FERREIRA NETO J.S., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., GONÇALVES V.S.P., SOUZA A.C. & VASCONCELLOS S.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:19-26.

BANNATYNE, C. C. *Brucella abortus* infection in a blackface ewe. **Veterinary Record**, v. 72, n. 33, p. 660-661, 1960.

BARR, S. C.; EILTS, B. E.; ROY, A. F. MILLER, R. *Brucella suis* biotype 1 infeccion in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 6, p. 686-687, 1986.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1999. 380 p.

BOLIN, C.A.; ALT, D.P. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Practitioner**, v.33, p. 50-55, 1999.

BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine Brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. Infectious diseases of livestock. Austin: Texas A&M University Press, College Station, p.1053-1066. 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional DE Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de leptospirose**. Brasília:, 98 p. 1995.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006.

BROD, C.S.; FEHBERG, M.F. Epidemiologia da Leptospirose em bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, p. 239-45, 1992.

CHATE S.C., DIAS R.A., AMAKU M., FERREIRA F., MORAES G.M., COSTA NETO A.A., MONTEIRO L.A.R.C., LÔBO J.R., FIGUEIREDO V.C.F., GONÇALVES

V.S.P. & FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:46-55.

CHU, M. C.; WEYANT, R. S. Francisella and Brucella. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington: ASM Press, 2003. p. 789-804.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2a ed., São Paulo: MEDSI, 1992, 843p.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 195-215.

COSTA, M. C. R.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; MARTINS, N. R. S. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 1, p. 11-17, 1998.

COSTA, M. Brucelose Bovina e Equina. In: RIET-CORREA, Franklin et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. v.1. 2.ed. São Paulo: Varela, 2003. 425p.

CRAWFORD, R. P.; HUBER, J. D.; ADAMS, B. S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 131-151.

CLOECKAERTA, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; PAQUET, J.Y.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G.; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. **Microbes and Infection**, N. 3, p. 729-738, 2001.

DIAS J.A., MÜLLER E.E., DIAS R.A., FREITAS J.C., AMAKU M., FERREIRA F., SILVA M.C.P., LÔBO J.R., FIGUEIREDO V.C.F., GONÇALVES V.S.P. & FERREIRA NETO J.S. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:66-76.

DIAS R.A., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., LIMA Z.M.B., PAULIN L.M.S., GUNNEWIEK M.F.K., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S. & FERREIRA F. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:118-125.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2ed. Melbourne, Austrália: Medicine Science, 1999. 272 p.

FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health, Organization, 1982.171p. (Who off set Publication, 67).

FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA-NETO, J. S. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos , ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados Brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FORBES, L. B. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 911-916, 1990.

FOSTER, G., B. S.; OSTERMAN; J. GODFROID; I. JACQUES, A. CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** N.57, p.2688-2693, 2007.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S. GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.

GONÇALVES V.S.P., DELPHINO M.K.V.C., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., PORTO T.B., ALVES C.M., FIGUEIREDO V.C.F. & LÔBO J.R. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:35-45.

GONÇALVES V.S.P., RIBEIRO L.A., CALDAS R.A., FRANCISCO P.F.C., DIAS

R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. & BORGES J.R.J. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:14-18.

GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. & FERREIRA F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:103-108.

GUIMARÃES, M. C.; CÔRTEZ, J.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H. Epidemiologia e controle da leptospirose bovina. Importância do portador renal e do seu controle terapêutico. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 6/7, n. 1/4, p. 1982/1983.

HANSON, L. E. Leptospirosis in domestic animals: the public health perspective. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 12, p. 1505-1509, 1982.

HARTGAN, P. J. Human brucellosis: Epidemiology and clinical manifestations. **Irish veterinary Journal**, v. 50, n. 2, p. 179-180, 1997.

HUBÁLEK, Z.; H.C. SCHOLZ, H.C.; SEDLÁČEK, I.; MELZER, F.; SANOGO, Y.O.; NESVADBOVÁ, J. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. December 2007, v.7, n.4, p. 679-688.

IKRAM, M.; HILL, E. Microbiology for veterinary technicians. 1. ed. Goleta: American Veterinary Publications, 1991.

KLEIN-GUNNEWIEK M.F.C., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA F., GITTI C.B., PEREIRA L.A., FIGUEIREDO V.C.F., LOBO J.R., GONÇALVES V.S.P. & FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:77-84.

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MÜLLER, E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J. C. M.; FERREIRANETO, J. S.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal**

(PNCEBT). 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006, 188 p. (Manual Técnico).

LANGONI, H. **Introdução as Zoonoses**. Apostila da Disciplina de Zoonoses da UNESP-Botucatu. São Paulo. 1996. 30p.

LANGONI, H.; SOUZA, L. C.; SILVA, A. V.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PAES, A. C.; LUCHESE, S. B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian diary cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3-4, p. 271-275, 1999.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? **Journal Medicine: Microbiology**, v. 48, p. 417-418, 1999.

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v.18, p. 9-13, 1996.

LUCHSING, D. W.; ANDERSON, R. K. Longitudinal studies of naturally acquired *Brucella abortus* infection in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 9, p. 1307-1312, 1979.

MARVULO M.F.V., FERREIRA F., DIAS R.A., AMAKU M., GROFF A.C.M., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. & FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:93-102.

MYERS, D. M. Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. **Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.**  
NOVA, A. V. Boletim Departamento Controle de Zoonoses e Vigilância Sanitária, Suplemento especial. v. 8, n. 2, 1985.

NEGREIROS R.L., DIAS R.A., FERREIRA F., FERREIRA NETO J.S., GONÇALVES

V.S.P., SILVA M.C.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., FREITAS J. & AMAKU M. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:56-65.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine, San Diego**, v. 24, p. 69-98, 1980.

OGATA R.A., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., RODRIGUES A.L., AMAKU M., FERREIRA F., FERREIRA NETO J.S. & DIAS R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:126-134.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O combate a brucelose bovina.** Situação Brasileira. 1 ed. FUNEP, São Paulo, Brasil. 2003. 154p.

PAULIN, L.M. Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.70, 2003. Disponível online em <[http://www.lispaulin@biologico.sp.gov.br/arquivo\\_v70](http://www.lispaulin@biologico.sp.gov.br/arquivo_v70)> Acesso em: 18 fev. 2006.

PEARCE, J. H.; WILLIAMS, A. E.; HARRIS-SMITH, P. W.; FITZGEORGE, R. B.; SMITH, H. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. II. rhytritol, a constituent of bovine foetal fluids which stimulates the growth of *Brucella abortus* in bovine phagocytes. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 43, p. 31-37, 1961.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Causas infecciosas de mortalidade embrionária e fetal em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 68-75, 2003.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, v. 2, p.1265-1276, 2000.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, p. 512, 2005.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**. 9. ed. W.B. Saunders, 2000 p. 1877.

RADOSTISTS, O. M, et al. **Clínica Veterinária**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RASHMIR-RAVEN, A.; GAUGHAN, E. M.; MODRANSKY, P.; CLEM, .M F. Fistulous withers. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinary**. V. 12, n. 11, p. 1633-1641, 1990.

RIET-CORREA, F. ; SCHILD, A.L. ; MÉNDEZ, M.C. ; LEMOS,R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo, v.2, 574 p.,2001.

RIEMANN, H. P.; CLIVER, D. O. Foodborne Infections and Intoxications.3 ed. California: **Elsevier Academic Press**, 2006, p. 346-347.

ROCHA W.V., GONÇALVES V.S.P., COELHO C.G.N.F.L., BRITO W.M.E.D., DIAS 1 R.A., DELPHINO M.K.V.C., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., Figueiredo V.C.F., Lôbo, J.R. & Brito L.A.B. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 61:27-34.

SALLES, R. S.; LILENBAUM, W. Leptospirose bovina no Brasil. **CFMV**, Brasília, v. 21, p. 42-46, 2006.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 60, n. 4, p. 801-808, 2010.

SHAW, W. B., *Brucella abortus* infection in sheep. I Field case. **British Veterinary Journal**, v. 132, n. 1, p. 18-27, 1976.

SIKUSAWA S., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA NETO J.S., MARTINS C., SILVA V.G.S.O., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., COSTA E.L.S., LÔBO J.R.,

FIGUEIREDO V.C.F., GONÇALVES V.S.P. & FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:109-117.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 5, p. 216–223, 1974.

THIERMANN, A.B. Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms of the hebdomadis serogroup. **American Journal Veterinary Research**, v.43, p.780- 84, 981/1982.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworths, 1986. 280 p.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 607-609.

VASCONCELLOS, S. A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicado Científico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - USP**.v. 11, n. 1, p.17-24, 1987.

VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A. As bases para a prevenção da brucelose animal. **Comum. Cient. Fac. Méd. Vet. Zootec.da Universidade de São Paulo - USP**, v.11, n. 1, p. 25-36, 1987.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose animal. In: Encontro Nacional em Leptospirose, 3., 1993, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro; publicado, 1996, p. 62-66.

VILLAR K.S., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA NETO J.S., BENITEZ F., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. & FERREIRA F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:85-92.

## **CAPÍTULO II**

### **Soroepidemiologia da leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar do Agreste paraibano, Nordeste do Brasil**

Manuscrito submetido à revista  
Pesquisa Veterinária Brasileira-  
ISSN 1678-5150 versão online.

# Soroepidemiologia da leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar do Agreste paraibano, Nordeste do Brasil<sup>1</sup>

Robério M. Oliveira<sup>2</sup>, Meire M.S. Macêdo<sup>2</sup>, Severino S.S. Higino<sup>2</sup>, Maria L.C.R. Silva<sup>2</sup>, Lília M. Paulin<sup>3</sup>, Clebert J. Alves<sup>2</sup>, Maria G.X. Carvalho<sup>2</sup>, Sérgio S. Azevedo<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**— Oliveira R.M., Macêdo M.S., Higino S.S.S., Silva M.L.C.R., Paulin L.M., Alves C.J., Carvalho M.G.X. & Azevedo S.S. 2012. [**Seroepidemiology of bovine leptospirosis and brucellosis in family farm rural properties in the Agreste of Paraíba State, Northeastern Brazil**] Soroepidemiologia da leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar do Agreste paraibano, Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0);00-00. Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Av. Universitária, s/nº, CEP 58700-970, Patos, PB, Brasil. E-mail: [sergio.azevedo@pq.cnpq.br](mailto:sergio.azevedo@pq.cnpq.br)

The aim of this investigation was to determine the frequency of positive herds and seropositive animals to bovine leptospirosis and brucellosis in family farm rural properties from the Agreste mesoregion of the Paraíba State, as well as to identify risk factors. Blood samples were collected from 771 animals from 130 herds in five municipalities. For the serological diagnosis of leptospirosis the microscopic agglutination test (MAT) using 24 *Leptospira* spp. serovars as antigens was carried out, and for brucellosis the Rose-Bengal Test (RBT) was used as screening test and the 2-mercaptoethanol test (2-ME) as confirmatory test. For leptospirosis, the frequency of positive herds and seropositive animals were 18.4% and 3.6%, respectively; for brucellosis 7.7% of the herds and 1.9% of the animals were positive. The most frequent *Leptospira* spp. serovar was Hardjo. Bovine purchase was identified as risk factor to bovine brucellosis (odds ratio = 5.25; p = 0.044). It was suggested the need for adoption and/or intensification of control and prevention measures aiming to avoid economic losses and transmission of the agents to humans, as well as the purchase of animals with known sanitary condition.

INDEXING TERMS: *Leptospira* spp., *Brucella abortus*, family farm properties, serology, risk factors.

**RESUMO.**—Este trabalho teve como objetivo determinar a frequência de rebanhos positivos e de animais soropositivos para leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar da mesorregião do Agreste, Estado da Paraíba, bem como identificar fatores de risco. Foram colhidas amostras de sangue de 771 animais procedentes de 130 rebanhos em cinco municípios. Para o diagnóstico sorológico da leptospirose foi utilizado o teste de soroaglutinação microscópica (SAM), com 24 sorovares de *Leptospira* spp. como antígenos, e para brucelose, o teste do

---

<sup>1</sup> Recebido em.....

Aceito em .....

<sup>2</sup> Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Av. Universitária, s/nº, CEP 58700-970, Patos, PB, Brasil. Autor para correspondência: [sergio.azevedo@pq.cnpq.br](mailto:sergio.azevedo@pq.cnpq.br)

<sup>3</sup> Centro de Desenvolvimento e Pesquisa de Sanidade Animal, Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

antígeno acidificado tamponado (AAT) foi utilizado como prova de triagem e o teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) como prova confirmatória. Para leptospirose, a frequência de propriedades positivas e animais soropositivos foram de 18,4% e 3,6%, respectivamente; para brucelose 7,7% das propriedades e 1,9% dos animais foram positivos. O sorovar de *Leptospira* spp. mais frequente foi o Hardjo. Comprar bovinos foi identificado como fator de risco para brucelose bovina (*odds ratio* = 5,25;  $p = 0,044$ ). Sugere-se a necessidade de adoção e/ou intensificação de medidas de prevenção e controle com o objetivo de evitar perdas econômicas e transmissão dos agentes aos seres humanos, bem como a compra de animais precedida do conhecimento da sua condição sanitária.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Leptospira* spp., *Brucella abortus*, propriedades de agricultura familiar, sorologia, fatores de risco

## INTRODUÇÃO

A atividade agropecuária brasileira tem assumido, nos últimos anos, importante participação na economia, sendo um componente relevante do Produto Interno Bruto (PIB) e da geração de riqueza do país. A pecuária bovina ganhou relevância, tanto no cenário interno quanto externo, e atualmente o Brasil possui um dos principais rebanhos comerciais do mundo (IBGE 2006). O Brasil é um dos principais países produtores de leite, apresentando uma taxa de crescimento anual de 4%, superior à dos países que ocupam os primeiros lugares. Em análise retrospectiva, a produção brasileira de leite nos últimos 25 anos aumentou 150%, passando de 8 bilhões de litros no ano de 1975 para 19,8 bilhões no ano 2000, ultrapassando 26 bilhões em 2007 (Embrapa Gado de Leite 2012).

No Censo Agropecuário de 2006 foram identificados 4.367.902 estabelecimentos de agricultura familiar no Brasil, responsáveis por 58% de todo o leite produzido no país. No Estado da Paraíba, 69% do leite foram produzidos em estabelecimentos de agricultura familiar (IBGE 2006). Neste contexto, o conhecimento da frequência de ocorrência de agentes infecciosos, tais como brucelose e leptospirose, que causam diminuição da produção de leite, torna-se indispensável. Ambas as doenças estão incluídas na lista de doenças da Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organization for Animal Health – OIE*), ou seja, são doenças transmissíveis de importância sócio-econômica e/ou de saúde pública e que podem ter impacto significativo no comércio internacional de animais e de seus subprodutos (OIE 2011).

A brucelose bovina é uma doença bacteriana de evolução crônica e caráter granulomatoso difuso, caracterizada pela infecção de células do sistema mononuclear fagocitário, causada por uma bactéria intracelular facultativa integrante do gênero *Brucella*, e apresentando-se em todo o mundo como problema sanitário e econômico (Paulin & Ferreira Neto 2003). O principal agente etiológico é a *Brucella abortus*, cujo biotipo 1 é o mais frequente (Acha & Szyfres 2001). As perdas diretas provocadas pela brucelose bovina são decorrentes de abortamentos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção de carne e leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas. Estimativas mostram que a infecção é responsável pela diminuição de 20 a 25% na produção de leite, 10 a 15% na produção de carne, 15% de perda de bezerros em decorrência de abortamentos, aumento de 30% na taxa de reposição de animais e aumento do intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses. Mostram ainda que, em cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril (Acha & Szyfres 2001).

A leptospirose é uma zoonose bacteriana causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. Com vasta distribuição geográfica, é evidenciada em todo o mundo e

particularmente prevalente em países de clima tropical e subtropical, principalmente nos períodos de altos índices pluviométricos (Acha & Szyfres 2001) devido à elevada sobrevivência da bactéria em ambientes úmidos, o que aumenta o risco de exposição e contaminação de animais susceptíveis e seres humanos. As perdas econômicas causadas pela leptospirose estão direta ou indiretamente ligadas às falhas reprodutivas como infertilidade e abortamento, bem como à queda da produção de carne e leite, além de custos com despesas de assistência veterinária, vacinas e testes de laboratório (Faine et al. 1999).

Considerando a importância da brucelose e da leptospirose bovina nos aspectos de saúde pública e de perdas econômicas para a produção de bovinos, o objetivo do presente trabalho foi determinar a frequência de rebanhos positivos e de animais soropositivos para ambas as infecções, bem como identificar fatores de risco, em propriedades rurais de agricultura familiar do Agreste do Estado da Paraíba.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 771 bovinos (523 fêmeas e 248 machos) procedentes de 130 propriedades rurais de agricultura familiar em cinco municípios da mesorregião do Agreste paraibano: Araruna (32 propriedades e 183 animais), Belém (43 propriedades e 297 animais), Cacimba de Dentro (35 propriedades e 211 animais), Areial (11 propriedades e 59 animais) e Massaranduba (nove propriedades e 21 animais) (Figura 1). Não foram adotados critérios probabilísticos para a escolha das propriedades e dos animais, sendo esta baseada no consentimento dos proprietários.

O trabalho de campo foi conduzido de julho a agosto de 2011, e incluiu a colheita de sangue e aplicação de questionário epidemiológico (anexo I). As amostras de sangue foram colhidas de machos e fêmeas com idade igual ou superior a oito meses, em volumes de 10mL, pela punção da veia jugular com agulha descartável e tubo com vácuo (sem anticoagulante) com capacidade de 15mL. Após o dessoramento, o soro foi transferido para microtubos e congelado. O transporte das amostras para o laboratório foi feito em caixas de isopor com gelo.

O diagnóstico sorológico da leptospirose foi realizado com a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), de acordo com Galton et al. (1965) e Cole et al. (1973), utilizando uma coleção de antígenos vivos que incluiu os sorovares Castellonis, Javanica, Tarassovi, Whitcombi, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippytyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Sentot, Wolffi, Pyrogenes, Butembo, Cynopteri, Panama, Shermani, Andamana e Patoc. Os soros foram triados na diluição de 1:100, e aqueles que apresentaram 50% ou mais de aglutinação foram titulados pelo exame de uma série de diluições geométricas de razão dois. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo. Os antígenos eram examinados ao microscópio de campo escuro, previamente aos testes, a fim de verificar a mobilidade e a presença de auto-aglutinação ou de contaminantes.

Para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) foi utilizado como prova de triagem e os soros que reagiram positivamente no mesmo foram submetidos à prova confirmatória do 2-mercaptoetanol (2-ME) (Brasil 2006). Paralelamente ao teste do 2-ME, foi realizado o teste de Soroaglutinação Lenta em Tubos (SALT).

Uma propriedade foi considerada positiva quando apresentou pelo menos um animal soropositivo. Para a leptospirose, dentro da propriedade, o sorovar mais frequente foi aquele que apresentou maior número de animais soropositivos. Para a análise de fatores de risco, foram formados dois grupos de propriedades - positivas e negativas - que, quando comparadas entre si quanto às variáveis pesquisadas no questionário epidemiológico, permitiu medir a força da associação dessas variáveis com a presença das doenças. As variáveis analisadas foram: tipo de criação

(confinado, semi- confinado, extensivo), tipo de exploração (corte, leite e misto), número de vacas em lactação, produção diária de leite e tamanho do rebanho (mediana como ponto de corte), presença de outros animais na propriedade (caprino/ovinos, equídeos, suínos, aves, cães e gatos), ocorrência de abortamento, comprar bovinos com finalidade de reprodução, aluguel de pastos, compartilhar pastos, presença de áreas alagadiças, possuir piquetes de parição e assistência veterinária.

A análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, cada variável independente foi cruzada com a variável dependente (condição sanitária da propriedade). Aquelas que apresentaram valor de  $p \leq 0,2$  pelo teste de qui-quadrado (Zar 1999) foram selecionadas e usadas na análise multivariada, utilizando-se regressão logística múltipla (Hosmer & Lemeshow 2000). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%, e todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 20.0 for Windows.

## RESULTADOS

Das 130 propriedades investigadas, 24 (18,4%) apresentaram pelo menos um animal reagente na SAM para qualquer um dos 24 sorovares de *Leptospira* spp. empregados (Quadro 1). O sorovar Hardjo foi o mais frequente, com 29,16% de propriedades positivas, seguido pelos sorovares Patoc, Pomona e Australis, com 25%, 12,5% e 12,5% de propriedades positivas, respectivamente (Quadro 2). Dos 771 animais investigados 28 (3,6%) foram soropositivos (Quadro 1). Dentre as fêmeas e machos, 17 (3,3%) e 11 (4,4%) animais foram soropositivos, respectivamente, sem, contudo, haver diferença estatística ( $p = 0,411$ ). O sorovar mais frequente nos animais também foi o Hardjo, com 35,7% das reações, seguido pelos sorovares Patoc, Pomona e Australis, com 25%, 10,7% e 10,7% das reações, respectivamente (Quadro 2). Também foram observadas reações para os sorovares Sentot, Shermani e Copenhageni.

Para brucelose, 10 propriedades (7,7%) apresentaram animais soropositivos (Quadro 3). Dos 771 animais 15 (1,9%) foram soropositivos nos testes de triagem e confirmatório. Nenhum animal apresentou resultado inconclusivo. Dentre as fêmeas e machos, 13 (2,5%) e dois (0,81%) animais foram soropositivos, respectivamente, sem, contudo, haver diferença estatística ( $p = 0,163$ ).

Na análise univariada para os fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas para leptospirose, as variáveis selecionadas ( $p \leq 0,2$ ) foram (Quadro 4): presença de gatos ( $p = 0,112$ ), ocorrência de abortamentos ( $p = 0,097$ ) e comprar bovinos ( $p = 0,184$ ). No entanto, não foram identificados fatores de risco na análise múltipla.

Para brucelose, as variáveis selecionadas na análise univariada foram (Quadro 5): tipo de criação ( $p = 0,078$ ), presença de equídeos ( $p = 0,100$ ), comprar bovinos ( $p = 0,095$ ) e assistência veterinária ( $p = 0,181$ ). Na análise de regressão logística (Quadro 6), comprar bovinos foi identificado como fator de risco (*Odds ratio* = 5,25; IC 95% = 1,05 - 26,35;  $p = 0,044$ ).

## DISCUSSÃO

A aplicação da SAM para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em 771 bovinos provenientes de 130 propriedades rurais de agricultura familiar no Agreste paraibano permitiu a visualização da abrangência e da disseminação da infecção por leptospiros na região e, principalmente, os sorovares prevalentes. Foi observado que

em 18,4% das propriedades e em 3,6% dos animais foram detectados anticorpos anti-*Leptospira* spp. Castro et al. (2008) examinaram, pela SAM, 8.216 fêmeas bovinas procedentes de 1.021 propriedades do Estado de São Paulo e verificaram que as prevalências de propriedades positivas e de animais soropositivos foram de 71,3% e 49,4%, respectivamente. Já Oliveira et al. (2009), no Estado da Bahia, também utilizaram fêmeas bovinas e a SAM como teste de diagnóstico, e verificaram que de 1.414 propriedades 1.076 (77,93%) foram positivas, e de 10.823 animais 4.253 (45,42%) foram soropositivos. No presente trabalho, as frequências de propriedades positivas e de animais soropositivos foram muito inferiores às encontradas nesses estudos. As vacinas anti-leptospirose disponíveis no mercado são bacterianas inativadas baseadas na proteção dirigida ao antígeno LPS das leptospirosas, ressaltando-se sua interferência na SAM por cerca de seis meses após a vacinação (Freudenstein & Hein 1991, Nardi Júnior et al. 2007), o que poderia em algum momento deste estudo ter sido considerada como resposta sorológica positiva. É sabido que a vacinação contra a leptospirose bovina no Estado de Paraíba não é uma prática disseminada, diferentemente dos Estados de São Paulo e Bahia, nos quais a vacinação costuma ser empregada pelos proprietários. Isso pode justificar a baixa frequência de positividade encontrada no presente trabalho, uma vez que as reações sorológicas provenientes de anticorpos vacinais pode influenciar na frequência de animais soropositivos (Castro et al. 2008). Apesar disso, sugere-se que há necessidade de adoção e/ou intensificação de medidas de prevenção e controle com o objetivo de evitar perdas econômicas e transmissão do agente aos seres humanos.

O sorovar Hardjo foi o mais frequente no presente estudo tanto nas propriedades (29,1%) quanto nos animais (35,7%). Similarmente, nos Estados da Bahia e São Paulo, esse sorovar foi apontado como o mais prevalente nas propriedades e nos animais (Castro et al. 2008, Oliveira et al. 2009), confirmando os achados clássicos em bovinos. Este sorovar, também relatado como prevalente em rebanhos bovinos de outros países, tem sido reconhecido como significativa causa de falhas e alterações nos parâmetros reprodutivos (Higgins et al. 1980, Slee et al. 1983, Tebrugge & Dreyer 1985, Prescott et al. 1988, Ellis 1994, Faine et al. 1999, Guitian et al. 1999).

Além do sorovar Hardjo, que geralmente é transmitido entre bovinos, foi observada a ocorrência de reações para os sorovares Australis, Copenhageni, Pomona, Shermani, Patoc e Sentot. Esses sorovares são considerados acidentais para bovinos, e a transmissão indireta está associada ao contato com o meio ambiente contaminado por leptospirosas oriundas de espécies silvestres ou de outras espécies domésticas (Castro et al. 2008).

Apesar de não terem sido identificados fatores de risco para leptospirose, algumas variáveis merecem destaque em função da frequência de propriedades positivas. Propriedades com manejo extensivo, exploração de corte e sem realizar controle de roedores apresentaram frequências de positividade maiores em relação às outras categorias (18,6%, 33,3% e 21,7%, respectivamente). De fato, em propriedades com manejo extensivo, a chance de infecção aumenta uma vez que as possibilidades de os animais entrarem em contato com materiais contaminados com leptospirosas, como pastos, água e materiais de parto e abortamento, são maiores. Da mesma forma, em propriedades com exploração tipo corte, geralmente os rebanhos são grandes e mantidos pela compra de animais de outras propriedades sem, contudo, realização de diagnóstico de leptospirose. A não realização do controle de roedores é um fator de risco clássico para leptospirose, pois esses animais são os principais reservatórios da bactéria (Faine et al. 1999).

Dados oficiais da brucelose bovina obtidos em inquéritos sorológicos em vários Estados brasileiros indicaram prevalências de propriedades positivas e de animais soropositivos variando de 0,32-41,5% e 0,06-10,2%, respectivamente (Alves et al. 2009, Azevedo et al. 2009, Chate et al. 2009, Dias et al. 2009a, Dias et al. 2009b, Gonçalves et al. 2009a, Gonçalves et al. 2009b, Klein-Gunnewiek et al. 2009, Marvulo

et al. 2009, Negreiros et al. 2009, Ogata et al. 2009, Rocha et al. 2009, Sikusawa et al. 2009, Silva et al. 2009, Villar et al. 2009). No presente trabalho, 7,7% das propriedades foram positivas e 1,9% dos animais foram soropositivos, o que se encontra dentro da variação das prevalências obtidas em outros Estados.

O combate à brucelose bovina pode ser dividido em quatro fases distintas (Paulin & Ferreira Neto 2003): (a) rebaixamento da prevalência para valores inferiores a 2%, sendo necessário para isso uma cobertura vacinal de 80% com a vacina B19; (b) abandono da vacinação e adoção das medidas de diagnóstico e sacrifício sistemáticos dos animais soropositivos; (c) solução de problemas residuais; e (d) adoção de ações de vigilância para que o retorno da infecção seja impedido, ou caso reapareça, seja rapidamente detectado e eliminado. Com base no estudo epidemiológico realizado no Estado de Santa Catarina, no qual a prevalência de focos foi de 0,32% e a prevalência de animais soropositivos foi de 0,06% (Sikusawa et al. 2009), o MAPA publicou uma portaria em 2004 excluindo a obrigatoriedade de vacinação contra a brucelose bovina nesse estado (Brasil 2004).

No presente trabalho, não foi realizado um planejamento amostral para a região, bem como não foram estabelecidos critérios de seleção de propriedades e animais, o que pode influenciar na determinação das frequências de propriedades positivas e animais soropositivos, de modo que se torna incoerente sugerir alguma estratégia de ação. De qualquer maneira, considerando as elevadas frequências de focos e de animais soropositivos, sugere-se que esforços sejam concentrados na intensificação da vacinação de bezerras, com o intuito de que seja alcançada uma prevalência compatível com as ações de teste e sacrifício de animais.

A variável comprar bovinos foi apontada como fator de risco para a brucelose bovina. A compra de animais infectados é amplamente relatada como o principal fator de introdução de brucelose em rebanhos livres. Dos 15 Estados nos quais foram conduzidos estudos epidemiológicos como parte do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT), em seis (Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo) essa variável foi apontada como fator de risco (Alves et al. 2009, Dias et al. 2009a, Dias et al. 2009b, Gonçalves et al. 2009a, Klein-Gunnewiek et al. 2009, Rocha et al. 2009). Dentro dessa variável, alguns fatores podem atuar de forma independente ou em associação, como: frequência de compra, origem dos animais e histórico de realização de testes sorológicos para brucelose (Crawford et al. 1990, Alves et al. 2009). O verdadeiro problema não é a introdução de animais, prática rotineira nos rebanhos bovinos, mas sim a aquisição de animais sem cuidados sanitários, ou seja, sem a realização de testes ou sem o conhecimento da condição sanitária do rebanho de origem (Alves et al. 2009).

## **CONCLUSÃO**

Constatou-se que, para leptospirose, 18,4% das propriedades tiveram animais reagentes e 3,6% dos animais foram soropositivos, bem como o sorovar Hardjo foi o mais frequente, e para brucelose, 7,7% das propriedades foram positivas e 1,9% dos animais foram soropositivos, o que sugere a necessidade de intensificação e/ou adoção de medidas de prevenção e controle com o objetivo de evitar perdas econômicas e transmissão dos agentes aos seres humanos. Também sugere-se que a compra de animais seja precedida do conhecimento da sua condição sanitária.

## **REFERÊNCIAS**

Acha P. N. & Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Bacterioses e micosis. 3rd ed. OPAS, Washington. 416p.

- Alves A.J.S., Gonçalves V.S.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Bahiense L., Amaku M., Ferreira F., Ferreira Neto J.S. & Dias R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:6-13.
- Azevedo S.S., Ferreira Neto J.S., Dias R.A., Ferreira F., Amaku M., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Gonçalves V.S.P., Souza A.C. & Vasconcellos S.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:19-26.
- Brasil 2006. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília.
- Brasil 2004. Portaria, Excluir o Estado de Santa Catarina da obrigatoriedade de vacinação das fêmeas bovinas e bubalinas contra a brucelose. Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 de janeiro de 2004, Seção 1, (2):3.
- Castro V., Azevedo S.S., Gotti T.B., Batista C.S.A., Gentili J., Moraes Z. M., Souza G.O., Vasconcellos S.A. & Genovez M.E. 2008. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 75(1):3-11.
- Chate S.C., Dias R.A., Amaku M., Ferreira F., Moraes G.M., Costa Neto A.A., Monteiro L.A.R.C., Lôbo J.R., Figueiredo V.C.F., Gonçalves V.S.P. & Ferreira Neto J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:46-55.
- Cole J.R., Sulzer C.R. & Pulssely P.R. 1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. *Appl. Microbiol.* 5:976-980.
- Crawford R.P., Huber J.D. & Adams B.S. 1990. Epidemiology and surveillance, p.317-361. In: Nielsen K. & Duncan J.R. (Eds), *Animal brucellosis*. CRC Press, Boca Raton.
- Dias J.A., Müller E.E., Dias R.A., Freitas J.C., Amaku M., Ferreira F., Silva M.C.P., Lôbo J.R., Figueiredo V.C.F., Gonçalves V.S.P. & Ferreira Neto J.S. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:66-76.
- Dias R.A., Gonçalves V.S.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Lima Z.M.B., Paulin L.M.S., Gunnewiek M.F.K., Amaku M., Ferreira Neto J.S. & Ferreira F. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:118-125.
- Ellis W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10:463-478.
- Embrapa Gado de Leite. 2012. Produção de leite no Sudeste do Brasil. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteSudeste/index.html>. Acessado em 19 de março de 2012.

- Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. MediSci, Melbourne. 272p.
- Freudenstein H. & Hein B. 1991. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamsters. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 14(3):229-234.
- Galton M.M., Sulzer C.R., Santa Rosa C.A. & Fields M.J. 1965. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Appl. Microbiol.* 13:81-85.
- Gonçalves V.S.P., Delphino M.K.V.C., Dias R.A., Ferreira F., Amaku M., Ferreira Neto J.S., Porto T.B., Alves C.M., Figueiredo V.C.F. & Lôbo J.R. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:35-45.
- Gonçalves V.S.P., Ribeiro L.A., Caldas R.A., Francisco P.F.C., Dias R.A., Ferreira F., Amaku M., Ferreira Neto J.S., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R. & Borges J.R.J. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:14-18.
- Guitian J., Trumond M.C. & Hietala S.K. 1999. Infertility and abortion among first-lactation dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215:515-518.
- Higgins R.J., Harbourne J.F., Little T.W.A. & Stevens A.E. 1980. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with leptospira of the serotype Hardjo. *Vet. Rec.* 107:307-310.
- Hosmer D.W. & Lemeshow S. 2000. *Applied logistic regression*. John Wiley & Sons, New York. 375p.
- IBGE 2006. Censo Agropecuário de 2006, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/estadosat/temas.php?sigla=pb&tema=censoagro>. Acessado em 10 de janeiro de 2012.
- Klein-Gunnewiek M.F.C., Amaku M., Dias R.A., Ferreira F., Gitti C.B., Pereira L.A., Figueiredo V.C.F., Lobo J.R., Gonçalves V.S.P. & Ferreira Neto J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:77-84.
- Marvulo M.F.V., Ferreira F., Dias R.A., Amaku M., Groff A.C.M., Gonçalves V.S.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R. & Ferreira Neto J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:93-102.
- Nardi Júnior G., Genovez M.E., Ribeiro M.G., Castro V. & Jorge A.M. 2007. Interference of vaccinal antibodies on serological diagnosis of leptospirosis in vaccinated buffalo using two types of commercial vaccines. *Braz. J. Microbiol.* 38:363-368.
- Negreiros R.L., Dias R.A., Ferreira F., Ferreira Neto J.S., Gonçalves V.S.P., Silva M.C.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Freitas J. & Amaku M. 2009. Situação

- epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61:56-65.
- Ogata R.A., Gonçalves V.S.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Rodrigues A.L., Amaku M., Ferreira F., Ferreira Neto J.S. & Dias R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61:126-134.
- OIE. 2011. World Organization for Animal Health. Terrestrial animal health code. Bovine Brucellosis. Disponível em: <[http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre\\_1.11.3.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.11.3.htm)>. Acessado em 19 de março de 2012.
- Oliveira F.C.S, Azevedo S.S., Pinheiro S.R., Viegas S.A.R.A., Batista C.S.A., Coelho C.P., Moraes Z.M., Souza G.O., Gonçalves A.P., Almeida C.A.S. & Vasconcellos S.A. 2009. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. Arq. Inst. Biol. 76:539-546.
- Paulin L.M. & Ferreira Neto J.S. 2003. O combate à brucelose bovina: situação brasileira. Funep, Jaboticabal. 154p.
- Prescott J.F., Miller R.B., Nicholson V.M., Martin S.W. & Lesnick T. 1988. Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontário. Can. J. Vet. Res. 52:210-215.
- Rocha W.V., Gonçalves V.S.P., Coelho C.G.N.F.L., Brito W.M.E.D., Dias<sup>1</sup> R.A., Delphino M.K.V.C., Ferreira F., Amaku M., Ferreira Neto J.S., Figueiredo V.C.F., Lôbo, J.R. & Brito L.A.B. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61:27-34.
- Sikusawa S., Amaku M., Dias R.A., Ferreira Neto J.S., Martins C., Gonçalves V.S.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R. & Ferreira F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61:103-108.
- Silva V.G.S.O., Dias R.A., Ferreira F., Amaku M., Costa E.L.S., Lôbo J.R., Figueiredo<sup>1</sup> V.C.F., Gonçalves V.S.P. & Ferreira Neto J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61:109-117.
- Slee K.J., McOrist S. & Skillbeck N.W. 1983. Bovine abortion associated with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection. Aust. Vet. J. 60:204-206.
- Tebrugge L. & Dreyer T. 1985. *Leptospira interrogans* serovar hardjo associated with bovine abortion in South Africa. Onderstepoort J. Vet. Res. 52:51-52.
- Villar K.S., Amaku M., Dias R.A., Ferreira Neto J.S., Benitez F., Gonçalves V.S.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R. & Ferreira F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61:85-92.
- Zar J.H. 1999. Biostatistical Analysis. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River. 663p.

## Legenda da Figura

Fig. 1. Estado da Paraíba demonstrando os municípios e respectivos números de propriedades rurais utilizadas, na mesorregião do Agreste paraibano.

## Os Quadros

**Quadro 1. Frequência de leptospirose bovina por propriedade de agricultura familiar e por animal no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011**

Município	Propriedades			Animais		
	Total	Positivas	%	Total	Positivos	%
Araruna	32	07	21,8	183	09	4,9
Areial	11	01	9,0	59	01	1,6
Belém	43	06	13,9	297	08	2,6
Cacimba de Dentro	35	09	25,7	211	09	4,2
Massaranduba	09	01	11,1	21	01	4,7
Total	130	24	18,4	771	28	3,6

**Quadro2. Frequência de leptospirose bovina por propriedade de agricultura familiar e por animal no Agreste paraibano, segundo o sorovar reagente, no período de julho a agosto de 2011**

Sorovar	Propriedades		Animais	
	Proporção de propriedades positivas	Frequência (%)	Proporção de animais soropositivos	Frequência (%)
Australis	3/24	12,5	3/28	10,7
Copenhageni	1/24	4,1	1/28	3,6
Pomona	3/24	12,5	3/28	10,7
Hardjo	7/24	29,1	10/28	35,7
Shermani	2/24	8,3	2/28	7,1
Patoc	6/24	25	7/28	25
Sentot	2/24	8,3	2/28	7,1

**Quadro 3. Frequência de brucelose bovina por propriedade de agricultura familiar e por animal no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011**

Município	Propriedades			Animais		
	Total	Positivas	%	Total	Positivos	%
Araruna	32	04	12,5	183	07	3,8
Areial	11	01	9,0	59	01	1,6
Belém	43	04	9,3	297	06	2,0
Cacimba de Dentro	35	01	2,8	211	01	0,4
Massaranduba	09	00	0	21	00	0
Total	130	10	7,7	771	15	1,94

**Quadro4. Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para leptospirose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011**

Variáveis	Total de propriedades	Propriedades positivas (%)	Valor de p
Tipo de criação			
Semi-confinado	1	0 (0,0)	
Extensivo	129	24 (18,6)	1,000
Tipo de exploração			
Corte	12	4 (33,3)	
Leite	13	2 (15,4)	
Mista	105	18 (17,1)	0,374
Raça de bovinos predominante			
Zebu	1	0 (0,0)	
Europeu de leite	1	0 (0,0)	
Mestiço	128	24 (18,8)	0,795
Tamanho do rebanho			
Até 7 animais	70	15 (21,4)	
≥ 8 animais	60	9 (15,0)	0,475
Presença de caprino/ovino			
Sim	29	6 (20,7)	
Não	101	18 (17,8)	0,937
Presença de equídeos			
Sim	65	14 (21,5)	
Não	65	10 (15,4)	0,498
Presença de suínos			
Sim	35	7 (20,0)	
Não	95	17 (17,9)	0,984
Presença de aves			
Sim	120	21 (17,5)	
Não	10	3 (30,0)	0,392
Presença de cães			
Sim	117	22 (18,8)	
Não	13	2 (15,4)	1,000
Presença de gatos			
Sim	100	15 (15,0)	
Não	30	9 (30,0)	0,112*
Comprar bovinos			
Sim	83	12 (14,5)	
Não	47	12 (25,5)	0,184*
Vender bovinos			
Sim	25	3 (12,0)	
Não	105	21 (20,0)	0,566
Aluguel de pastos			
Sim	4	0 (0,0)	
Não	126	24 (19,0)	1,000
Compartilhar pastos			
Sim	3	0 (0,0)	
Não	127	24 (18,9)	1,000
Presença de áreas alagadiças			
Sim	11	1 (9,1)	
Não	119	23 (19,3)	0,688
Presença de roedores			
Sim	41	8 (19,5)	
Não	89	16 (18,0)	1,000
Realizar controle de roedores			
Sim	47	6 (12,8)	

Não	83	18 (21,7)	0,208
Possuir piquetes de parição			
Sim	18	2 (11,1)	
Não	112	22 (19,6)	0,524
Assistência veterinária			
Sim	22	2 (9,1)	
Não	108	22 (20,4)	0,364

\* Variáveis seleccionadas para análise múltipla ( $p \leq 0,2$ )

**Quadro5. Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011**

Variáveis	No. total de propriedades	No. de propriedades positivas (%)	Valor de p
Tipo de criação			
Semi-confinado	1	1 (100,0)	
Extensivo	128	9 (7,0)	0,078*
Tipo de exploração			
Corte	12	0 (0,0)	
Leite	13	1 (7,7)	
Mista	105	9 (8,6)	0,573
Raça de bovinos predominantes			
Zebu	1	0 (0,0)	
Europeu de leite	1	0 (0,0)	
Mestiço	128	10 (7,8)	0,918
Tamanho do rebanho			
Até 7 animais	70	5 (7,1)	
≥ 8 animais	60	5 (8,3)	1,000
Presença de caprino/ovino			
Sim	29	4 (13,8)	
Não	101	6 (5,9)	0,229
Presença de equídeos			
Sim	65	8 (12,3)	
Não	65	2 (3,1)	0,100*
Presença de suínos			
Sim	35	3 (8,6)	
Não	95	7 (7,4)	1,000
Presença de cães			
Sim	117	9 (7,7)	
Não	13	1 (7,7)	1,000
Comprar bovinos			
Sim	55	7 (12,7)	
Não	75	3 (4,0)	0,095*
Vender bovinos			
Sim	16	3 (18,8)	
Não	114	7 (6,1)	0,107*
Utilização de vacina contra brucelose			
Sim	37	2 (5,4)	
Não	93	7 (7,5)	1,000
Aluguel de pastos			
Sim	4	0 (0,0)	
Não	126	10 (7,9)	1,000
Compartilhar pastos			
Sim	3	0 (0,0)	
Não	127	10 (7,9)	1,000
Presença de áreas alagadiças			
Sim	11	0 (0,0)	
Não	119	10 (8,4)	1,000
Possuir piquetes de parição			
Sim	18	1 (5,6)	
Não	107	9 (8,4)	1,000
Assistência Veterinária			
Sim	22	3 (13,6)	
Não	108	6 (5,6)	0,181*

\* Variáveis selecionadas para análise múltipla ( $p \leq 0,2$ )

**Quadro 6. Fator de risco para brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar no Agreste paraibano, no período de julho a agosto de 2011**

Fator de risco	Odds ratio	IC 95%	Valor de p
Comprar bovinos	5,25	1,05 - 26,35	0,044

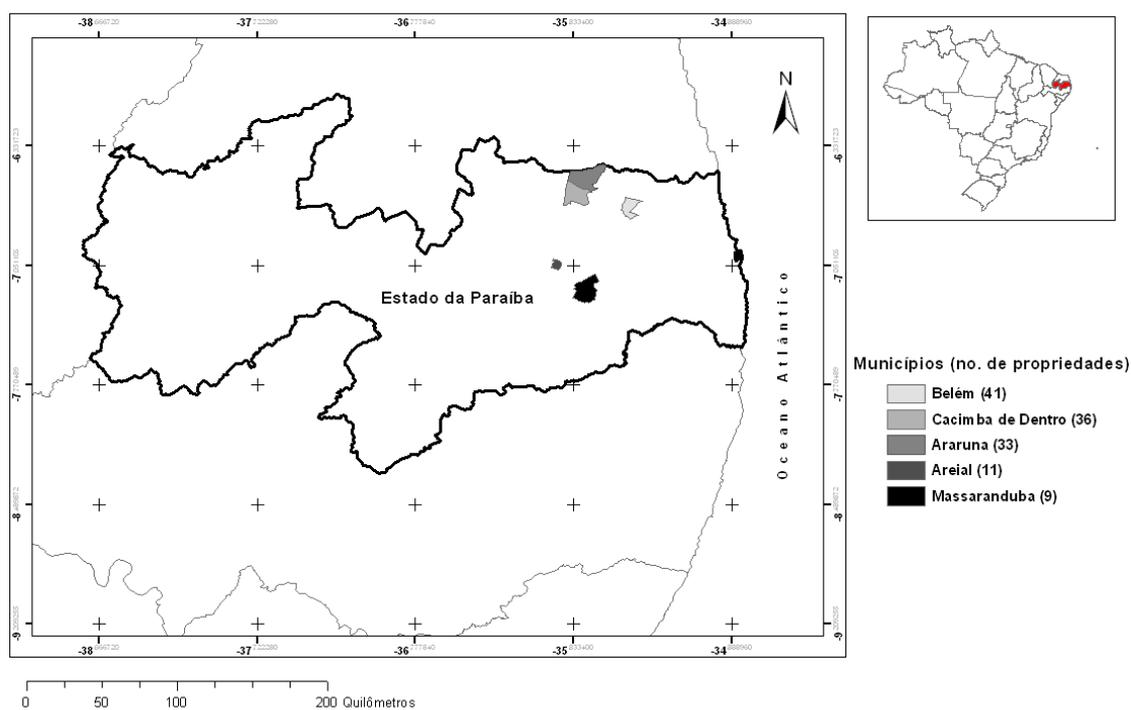


Figura 1

**ANEXO I - Modelo de questionário epidemiológico a ser aplicado nas propriedades amostradas**

<p><b>01- Identificação</b>                  Município: _____ U.F.: _____                   Proprietário: _____                   Propriedade: _____                   Código de cadastro no serviço de defesa: _____</p>	<p><b>02- Data da visita e colheita</b>                  _____ / _____ / _____</p> <p><b>03- Código do rebanho (9 dígitos)</b>                   __ __ __ __ __ __ __ __ __ </p> <p><b>04- Coordenadas</b>                  Lat _____° _____' _____'' Lon _____° _____' _____''                  Altitude _____</p>
---	---

**05- Tipo de exploração:**  corte  leite  mista  
**06- Tipo de criação:**  confinado  semi-confinado  extensivo  
**07- N° de ordenhas por dia:**  1 ordenha  2 ou 3 ordenhas  não ordenha  
**08- Tipo de ordenha:**  manual  mecânica ao pé  mecânica em sala de ordenha  não ordenha  
**09- Produção de leite:** (a) N° de vacas em lactação \_\_\_\_\_ (b) Produção diária de leite \_\_\_\_\_ litros  
**10- Usa inseminação artificial?**  não  usa inseminação artificial e touro  usa só inseminação artificial  
**11- Raça predominante: Bovinos** -  zebu  europeu de leite  europeu de corte  mestiço  outras

12- Bovinos existentes								
Machos castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)			
	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24	> 24
Total								

**13- Outras espécies na propriedade:**  ovinos/caprinos  eqüídeos  suínos  aves  cão  gato  
**14- Espécies silvestres em vida livre na propriedade:**  não tem  cervídeos  capivaras  outras  
**15- Alguma vaca abortou nos últimos 12 meses?**  não  sim  não sabe  
**16- O que faz com o feto abortado e a placenta?**  enterra/joga em fossa/queima  alimenta porco/cão  não faz nada  
**17- Faz testes para diagnóstico de leptospirose?**  não  sim  
**Regularidade dos testes:**  uma vez ao ano  duas vezes ao ano  quando compra animais  
 quando há casos de aborto na fazenda  quando exigido para trânsito/eventos/crédito  
**18- Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução?**  não  sim  
**Onde/de quem:**  em exposição  em leilão/feira  de comerciante de gado  de outras fazendas  
**19- Vende fêmeas ou machos para reprodução?**  não  sim  
**A quem/onde:**  em exposição  em leilão/feira  a comerciante de gado  a outras fazendas  
**20- Vacina contra brucelose?**  não  sim, apenas fêmeas até 8 meses de idade  sim, fêmeas de qualquer idade  
**21- Local de abate das fêmeas e machos adultos no fim da vida reprodutiva**  
 na própria fazenda  em estabelecimento de abate sem inspeção veterinária  
 em estabelecimento de abate com inspeção veterinária  não abate  
**22- Aluga pastos em alguma época do ano?**  não  sim  
**23- Tem pastos em comum com outras propriedades?**  não  sim  
**24- Existem na propriedade áreas alagadiças às quais o gato tem acesso?**  não  sim  
**25- Há ratos na propriedade?**  não  sim  
**26- Realiza controle de roedores?**  não  sim  
**27- Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto?**  não  sim  
**28- A quem entrega leite?**  cooperativa  laticínio  direto ao consumidor  não entrega  
**29- Resfriamento do leite:**  não faz  faz **Como:**  em resfriador ou tanque de expansão próprio  
 em resfriador ou tanque de expansão coletivo  
**30- A entrega do leite é feita a granel?**  não  sim  
**31- Produz queijo e/ou manteiga na propriedade?**  não  sim **Finalidade:**  consumo próprio  
 venda  
**32- Consome leite cru?**  não  sim  
**33- Tem assistência veterinária?**  não  sim **De que tipo:**  veterinário de cooperativa  
 veterinário particular

## ANEXO II - Instruções aos Autores

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados se não considerados para publicação em outra revista. **Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*). **NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 120,00 por página editorada e impressa,**

**na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.**

**1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no

trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida),

o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

## **2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:**

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br))**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**;

a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

**3. As Figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmos e escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitarse-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

**4. As legendas explicativas das Figuras** conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto auto explicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho**.

**5. Os Quadros deverão ser** explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro**; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

## ANEXO III - Modelo

**Deve ser seguido, em todos os pormenores, para a submissão de trabalhos à revista  
Pesquisa Veterinária Brasileira  
Trabalho .....**

### **Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina1**

Pedro M.O. Pedroso<sup>2</sup>, Caroline A. Pescador<sup>2</sup>, Paulo M. Bandarra<sup>2</sup>, Djeison L. Raymundo<sup>2</sup>, Mauro R. Borba<sup>2</sup>, Flademir Wouters<sup>3</sup>, Pedro S. Bezerra Júnior<sup>3</sup> e David Driemeier<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.-** Pedroso P.M.O., Pescador C.A., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Borba M.R., Wouters F., Bezerra Jr P.S. & Driemeier D. 2009. [Standardization of immunohistochemistry technique for detection of rabies virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples from central nervous system of cattle.] Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

For standardization of the rabies immunohistochemistry technique, five samples of central nervous system (CNS) of cattle naturally infected with rabies virus were examined. One polyclonal antibody and two monoclonal antibodies were used. The following reagents were evaluated for antigen retrieval: XIV protease, proteinase K and citrate buffer (pH 6.0) boiling at 100°C during 15 minutes in *bain-marie*. Detection of rabic antigen was possible with the three antibodies tested. The polyclonal antibody was superior to the monoclonal antibodies, demonstrating good results with the three antigen retrieval protocols. The highest intensity staining was obtained with the citrate buffer and heat. The immunohistochemistry technique demonstrated the presence of viral antigens in the cytoplasm of neurons, in form of aggregates or with round or oval shape. The antigens were found as single or multiples inclusion bodies in the neurons. Immunohistochemistry is a fast method that can be used in routine procedures in cases where rabies is suspected, especially when the brain is submitted to the laboratory as formalin-fixed fragments or when samples could not be immediately shipped. The technique is also useful for retrospective studies.

**INDEX TERMS:** Diseases of cattle, infectious diseases, diseases of the central nervous system, rabies, immunohistochemistry standardization.

1 Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

2 Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

3 Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil.

(Observe que os endereços dos autores devem ser completos, para que eles possam receber o “Exemplar do Autor” de seu trabalho publicado)

**RESUMO.-** Para a padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foram utilizadas cinco amostras de SNC de bovinos infectados naturalmente com o vírus da raiva usando-se um anticorpo policlonal e dois monoclonais. Para a recuperação antigênica foram avaliados os seguintes reagentes: protease XIV, proteinase K e tampão citrato pH 6,0 mantido a 100°C por 15 minutos. A detecção de antígeno rábico nas amostras foi possível com os três anticorpos

utilizados. O anticorpo policlonal foi superior aos anticorpos monoclonais, demonstrando bons resultados com os três protocolos de recuperação antigênica, obtendo uma maior intensidade de marcação quando utilizado o tampão citrato e calor. A técnica de imuno-histoquímica demonstrou a presença do antígeno viral no citoplasma de neurônios na forma de agregados de grânulos ou de forma redonda ou oval, mostrando corpúsculo de inclusão viral único a múltiplos nos neurônios. A imuno-histoquímica é um método rápido, podendo ser usada na rotina em casos onde inicialmente há suspeita de raiva, especialmente em casos onde fragmentos de cérebro submetidos ao laboratório foram fixados em formol, onde as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente e para a realização de estudos retrospectivos.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Doenças de bovinos, doenças infecciosas, doenças do sistema nervoso, raiva, padronização de imuno-histoquímica.

## INTRODUÇÃO

A raiva é causada por um vírus RNA, envelopado (Swanepoel 2004), da ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus* (Consales & Bolzan 2007) e é altamente neurotrópico (George 1993, Woldehiwet 2002). Embora todos os mamíferos sejam susceptíveis, canídeos e morcegos são considerados como os vetores mais eficientes da enfermidade (Woldehiwet 2002).

No Brasil, *Desmodus rotundus* é a principal espécie de morcego hematófago que transmite a raiva para bovinos, porém outras espécies (*Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*) podem ocasionalmente transmitir, a doença (Fernandes & Riet-Correa 2007). A raiva bovina ocorre em todo o Brasil e tem importância na maioria dos Estados, tanto pelo caráter de zoonose como por causar perdas econômicas na pecuária. Anualmente as perdas de bovinos por raiva são estimadas em aproximadamente 850.000 cabeças, que equivalem aproximadamente a 17 milhões de dólares (Lima et al. 2005). Em bovinos no Brasil, predomina a forma parálitica, caracterizada por paresia e paralisia ascendentes (Langohr et al. 2003). As lesões histológicas de raiva são geralmente limitadas ao sistema nervoso central (Jubb & Huxtable 1993, Jones et al. 2000), glânglios e nervos cranianos e espinhais (Swanepoel 2004) e caracterizam-se por meningoencefalomielite não-purulentas (Fernandes & Riet-Correa 2007) com ganglioneurite mononuclear (Swanepoel 2004).

O suporte laboratorial é imprescindível para o diagnóstico da doença e a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) em tecidos refrigerados ou congelados o teste padrão utilizado devido a sua rapidez e acurácia (Zimmer et al. 1990). Outro teste utilizado é a inoculação intracerebral em camundongos que apesar de ser mais específica, tem a desvantagem de ser demorada quando comparada a IFD (Germano et al. 1977).

A comparação entre métodos histoquímicos, de imunofluorescência direta e de inoculação intracerebral em camundongos tem revelado maior concordância entre imunofluorescência e inoculação intracerebral em camundongos, embora ocorram esporadicamente resultados falsos negativos ora em uma, ora em outra técnica (Côrtes et al. 1979).

O objetivo da padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foi estabelecer um protocolo padrão de diagnóstico para fragmentos de sistema nervoso central que chegam previamente fixados em formol 10% ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Contribuindo assim para o diagnóstico de doenças do SNC de bovinos, como parte do programa DXSNC de vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) codenada pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras encefalopatias (PNCRH) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de sistema nervoso central (SNC) de 2 bovinos registrados no arquivo do programa DXSNC do MAPA do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) e três amostras enviadas pelo Setor de Patologia

Veterinária da Universidade Federal de Lavras (SPV-UFLA) de necropsias de casos de bovinos infectados naturalmente com raiva, os quais obtiveram resultados positivos nos testes de imunofluorescência direta (IFD) e na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC).

Uma amostra do tronco cerebral de cada bovino necropsiado foi fixada em formol 10%, processada rotineiramente para exame histopatológico, incluída em parafina, cortada a 5µm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina (HE) (Prophet et al. 1992). Dados sobre os históricos, quadro clínico dos animais afetados foram obtidos com o veterinário requisitante ou pela própria equipe do SPV.

Para a padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foram feitos cortes histológicos de 5µm de espessura e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath), secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60°C por 3-4 horas. Após os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 15 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em água destilada três vezes por dois minutos. Para a recuperação antigênica foram avaliados os seguintes reagentes: protease XIV (Sigma Chemical Company, Poole, UK), proteinase K (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e tampão Citrato (2,1g de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%). As lâminas tratadas com protease XIV a 0,005% em PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,4) foram incubadas em câmara úmida por 15 minutos em temperatura ambiente. Os cortes tratados com proteinase K foram preparados com 40µl (uma gota) da solução diluída em 2ml 0,05M Tris-HCL pH 7,5 por 1 minuto em câmara úmida e temperatura ambiente. As lâminas tratadas com tampão citrato 10mM (pH 6,0), foram colocadas em jarras de coloração de polipropileno durante 15 minutos em banho-maria em panela de uso comercial de aço inox com dimensões de 24x20x20cm (altura x largura x comprimento) com capacidade para dois litros previamente aquecido atingindo uma temperatura de 100°C. Logo após as lâminas foram esfriadas por 5 minutos em temperatura ambiente.

Para a diminuição das ligações inespecíficas (“background”), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico®) 5% diluído em água destilada durante 15 minutos. Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário. Foram utilizadas as diluições de 1:500 e 1:1000 em PBS para cada um dos anticorpos testados. Foram avaliados dois anticorpos monoclonais anti-raiva (GeneTex GTX21002 e Bidesign C86307M) e um anticorpo policlonal (anti-rabies polyclonal Chemicon #5199) recomendado para imunofluorescência direta adaptado de Rech (2007). Os cortes testados com os anticorpos monoclonais foram incubados em câmara úmida por 12-14 horas (“overnight”) a 4°C e os testados com o anticorpo policlonal foram incubados em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, foram lavados em água destilada e tratados com anticorpo secundário biotinalado (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) por 20 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Logo após foram lavados em água destilada e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA) por mais 20 minutos cada em câmara úmida e temperatura ambiente, sendo lavados novamente em água destilada e submetidos à revelação com o cromógeno vermelho (VECTOR®NovaRED) por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-

corados com hematixilina de Haris por 1 minuto, posteriormente lavados em água corrente por 1-2 minutos e desidratados em graduação de álcool classificados em xilol e montados com óptico e classificadas de acordo com a intensidade de marcação em 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (acentuado). Foi inserido em cada imuno-histoquímica um controle de SNC de bovino previamente negativo nas provas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos.

## RESULTADOS

Os bovinos deste estudo apresentaram um quadro clínico caracterizado por incoordenação, paresia e paralisia dos membros posteriores, decúbito e morte. Todas as cinco amostras analisadas caracterizaram-se na histologia por meningoencefalomielite não-supurativa, com presença de manguitos perivasculares, microgliose e presença de corpúsculos de inclusão viral intracitoplasmáticos em neurônios. O teste de imunofluorescência direta para raiva e inoculação intracerebral em camundongos foi positivo em todos os casos analisados e serviu de padrão para avaliação do método imuno-histoquímico.

A detecção de antígeno rábico nas amostras analisadas foi possível com os três anticorpos utilizados. Em geral, os resultados usando o anticorpo policlonal foram superiores aos anticorpos monoclonais. O anticorpo policlonal (Chemicon #5199) demonstrou bons resultados com os três protocolos de recuperação antigênica, porém teve maior intensidade de marcação quando utilizado calor com solução de tampão citrato, obtendo-se grau de marcação acentuado nos casos testados (Fig.1). Podem-se identificar marcação no pericário, axônios (Fig.2) e algumas vezes em dendritos dos neurônios. Recuperação antigênica com protease XIV e proteinase K obtiveram intensidade de marcação semelhantes, prevalecendo uma marcação moderada em ambos tratamentos enzimáticos. No Quadro 1 estão representados os graus de intensidade de marcação imuno-histoquímica com o anticorpo policlonal nos cinco casos analisados no presente estudo.

A digestão com protease XIV e proteinase K apresentou baixa intensidade de marcação com os anticorpos monoclonais. O anticorpo GeneTex apresentou marcação leve nas recuperações antigênicas com protease XIV e proteinase K e o anticorpo Biodesign obteve melhor marcação quando utilizado proteinase K, ambos na diluição de 1:500. A intensidade de marcação com o anticorpo GeneTex (GTX 21002) e Biodesign (C86307M) estão representados nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Na recuperação antigênica com calor e tampão citrato os dois anticorpos monoclonais apresentaram ausência de marcação. Todos os casos que foram positivos na técnica de imuno-histoquímica demonstraram a presença do antígeno viral no citoplasma de neurônios na forma de agregados de grânulos (Fig.3) também na forma redonda ou oval, mostrando corpúsculo de inclusão viral único a múltiplos nos neurônios (Fig.4).

Na determinação da diluição do anticorpo policlonal anti-raiva, foram obtidos resultados positivos nas diluições de 1:500 e 1:1000. Perda na qualidade da identificação do antígeno de raiva foi visualizado quando os anticorpos foram diluídos a 1:1500. O bloqueio das reações inespecíficas mostrou-se bastante eficaz quando os cortes foram incubados com leite em pó desnatado (Molico®) 5% diluídos em água destilada durante 15 minutos.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico de raiva nas cinco amostras analisadas foi baseado no quadro clínico e nas lesões histopatológicas, sendo confirmados pelo teste de imunofluorescência direta para raiva e inoculação intracerebral em camundongo. A imuno-histoquímica se mostrou satisfatória para o diagnóstico de raiva a partir de fragmentos de sistema nervoso central destes casos. As cinco amostras de SNC utilizadas na padronização da técnica de imuno-histoquímica foram fixadas em formol 10% por um período que variou de 24 horas a uma semana.

Foi possível observar que o anticorpo policlonal empregado apresentou marcação mais intensa que os anticorpos monoclonais. Este resultado difere do que já foi relatado por outros autores (Hamir & Moser 1994, Hamir et al. 1995). Os anticorpos policlonais em geral apresentam alta afinidade e ampla reatividade (Ramos-Vara 2005). A utilização de anticorpos policlonais possibilita que uma maior quantidade de epítomos seja marcada, uma vez que há uma grande variação na fonte de animais utilizados na produção de antígenos (Van Maanen et al. 2004). Estes são geralmente empregados nos testes de rotina de imunofluorescência direta pra raiva (Terra 2007).

A recuperação antigênica utilizando-se solução tampão citrato previamente aquecida em banho-maria a 100oC possibilitou intensa marcação com o anticorpo policlonal. Diversos métodos de recuperação antigênica usando calor têm sido utilizados em IHQ como autoclave (Bankfalvi et al. 1994), panela de pressão (Norton et al. 1994, Miller & Estran 1995), forno de microondas (Gown et al. 1993, Cattoretti & Suurmeijer 1995, Imam et al. 1995) e banho-maria (Kawai et al. 1994), com o objetivo de quebrar as ligações cruzadas e expor os epítomos para o reconhecimento do anticorpo primário (Puchtler & Meloan 1985, Anthony et al. 1989, Shi et al. 1997). No presente estudo só foi usado banho-maria com a utilização de panela doméstica com água aquecida a 100oC, apresentando excelente resultado. Machado et al. (2004) obteve bons resultados com a técnica de imuno-histoquímica para raiva utilizando tampão citrato com calor, porém usando forno de microondas seguido de digestão enzimática com tripsina 0,1%.

As lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath) atraem eletrostaticamente as secções de tecido incluídas em parafina, aderindo-os melhor a lâmina e assim demonstraram ser melhores que lâminas preparadas com gelatina. Os cortes nestas últimas com freqüência se descolavam quando aquecidos para recuperação antigênica em microondas e banho-maria.

A imuno-histoquímica é um método rápido, podendo ser usado na rotina em casos onde inicialmente há suspeita de raiva (Machado et al. 2004), especialmente em casos onde fragmentos de cérebro submetidos ao laboratório foram fixados em formol, impossibilitando a realização da imunofluorescência direta ou a inoculação intracerebral em camundongos. Por vezes a detecção de antígenos do vírus da raiva por imuno-histoquímica tem sido relatada mesmo em tecido nervoso em processo de autólise (Arslan et al. 2004). Estudos feitos com materiais deteriorados comprovaram que o primeiro exame que resulta em falso negativo é a detecção dos corpúsculos de Negri, seguido pela inoculação em camundongos e, por último, a imunofluorescência direta (Fernandes & Riet-Correa 2007). A imuno-histoquímica permite o uso de tecidos fixados em formol, o que possibilita o envio das amostras ao laboratório quando condições de refrigeração e transporte são inadequadas (Hamir & Moser 1994). A imuno-histoquímica pode ser também usada, particularmente em estudos retrospectivos, quando tecidos frescos ou congelados não podem ser avaliados ou quando as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente. (Arslan et al. 2004).

Os resultados do presente trabalho demonstram que a técnica de imuno-histoquímica para raiva utilizando-se anticorpo primário policlonal Chemicon #5199 apresentou excelentes resultados quando tratados com calor e solução de tampão citrato na recuperação antigênica. A utilização deste anticorpo policlonal associado à recuperação antigênica com tampão citrato em banho-maria demonstrou também vantagem econômica visto que os materiais empregados foram de menor custo quando comparados com outros protocolos. Proporcionou também economia de tempo, pois com os dois anticorpos monoclonais e recuperação antigênica com protease XIV e proteinase K necessitou-se deixar “overnight”, aumentando o tempo para finalizar o diagnóstico. A imuno-histoquímica é uma ferramenta importante de diagnóstico de rotina laboratorial, especialmente quando o SNC é submetido fixado em formol 10%, impossibilitando a realização de provas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em 6 camundongos, além de, solucionar casos de meningoencefalite não-específica sem a presença de corpúsculos de inclusão.

**Agradecimentos.-** À Professora Mary Suzan Varaschin, Universidade Federal de Lavras, pelas amostras de SNC de bovinos com raiva. Às técnicas de Laboratório, Ângela Belmonte de Souza e Marília de Oliveira Belmonte, pela confecção do material de estudo. Aos colegas do Setor de Patologia Veterinária, UFRGS, pela valiosa ajuda deste trabalho. À Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Anthony S., Leong Y. & Gilham P.N. 1989. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathol.* 21:266-268.
- Arslan A., Saglam Y.S. & Temur A. 2004. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique. *Vet. Rec.* 155:550-552.
- Bankfalvi A., Navabi H., Bier B., Böcker W., Jasani B. & Schmid K.W. 1994. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J. Pathol.* 174:223-228.
- Cattoretti G. & Suurmeijer A.J.H. 1995. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: A review. *Adv. Anat. Pathol.* 2:2-9.
- Consales C.A. & Bolzan V.L. 2007. Rabies review: Immunopathology, clinical aspects and treatment. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 13:5-38.
- Côrtes V.A., Paim G.V. & Oliveira M.C.G. 1979. Diagnóstico da raiva canina. *Revta Saúde Pública* 13:353-356.
- Fernandes C.G. & Riet-Correa F. 2007. Raiva, p.184-198. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.1. Pallotti, Santa Maria. 719p.
- George L.W. 1993. Moléstias do sistema nervoso, p.901-1039. In: Smith B.P. (Ed.), *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*. Vol.2. Manole, São Paulo. 1738p.
- Germano P.M.L., Miguel O. & Chamelet E.L.B. 1977. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos, aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. *Revta Fac. Med. Vet. Univ. São Paulo* 14:133-141.
- Gown A.M., Wever N. & Battifora H. 1993. Microwave-based antigenic unmasking. *Appl. Immunohistochem.* 1:256-266.
- Hamir A.N. & Moser G. 1994. Immunoperoxidase test for rabies: Utility as a diagnostic test. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:148-152.
- Hamir A.N., Moser G., Fu Z.F., Dietzschold B. & Rupprecht C.E. 1995. Immunohistochemical test for rabies: Identification of a diagnostically superior monoclonal antibody. *Vet. Rec.* 136:295-296.
- Imam S.A., Young L., Chaiwun B. & Taylor C.R. 1995. Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining. *Anticancer Res.* 15:1153-1158.
- Jones T.C., Hunt R.D. & King N.W. 2000. *Patologia Veterinária*. 6a ed. Manole, São Paulo. 1415p.
- Jubb K.V.F. & Huxtable C.R. 1993. The nervous system, p.267-437. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), *Pathology of Domestic Animals*. Vol.1. 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Kawai A., Serizawa A. & Tsutsumi Y. 1994. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol. Int.* 44:759-764.
- Langohr I.M., Irigoyen L.F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2003. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural* 33:25-131.

- Machado G.F., Silva L.H.Q. & Nunes C.M. 2004. Detecção de antígenos do vírus da raiva em encéfalos de cão mantido em formol durante longo período. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 99:89-92.
- Miller R.T. & Estran C. 1995. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker: Suggestions for optimal use. *Appl. Immunohistochem.* 3:190-193.
- Norton A.J., Jordan S. & Yeomans P. 1994. Brief, high temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J. Pathol.* 173:371-379.
- Puchtler H. & Meloan S.N. 1985. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochem.* 82:201-204.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology.* American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279p.
- Ramos-Vara J.A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42:405-426.
- Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 228p.
- Shi S., Cote R.J. & Taylor C.R. 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J. Histochem. Cytochem.* 45:327-343.
- Swanepoel R. 2004. Rabies, p.1123-1182. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock.* Vol. 2. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town. 795p.
- Terra S.A. 2007. Características das encefalites em autópsias - aspectos epidemiológicos e morfológicos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba. 106p.
- Van Maanen C., Wouda W., Schares G., Von Blumröder D., Conraths F.J., Norton R., Williams D.J.L., Esteban-Redondo I., Innes E.A., Mattsson J.G., Björkman C., Fernández-García A., Ortega-Mora L.M., Müller N., Sager H. & Hemphill A. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet. Parasitol.* 126:351-364.
- Woldehiwet Z. 2002. Rabies: Recent developments. *Res. Vet. Sci.* 73:17-25.
- Zimmer K., Wiegand D., Manz D., Frost J.W., Reinacher M. & Frese K. 1990. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. *Zentralbl. Veterinärmed B* 37:392-400.

### **Exemplos adicionais para apresentação de Referências**

#### **Livro de um ou mais autores, os quais são também os Editores**

- Summers B.A., Cummings J.F. & De Lahunta A. 1995. *Veterinary Neuropathology.* Mosby, St Louis, p.95-188.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. 2000. Plantas hepatotóxicas, p.80-110. In: *Ibid.* (Eds), *Plantas Tóxicas do Brasil.* Editora Helianthus, Rio de Janeiro.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis.* 4th ed. Prentice Hall, New Jersey. 663p.

[Observe que os títulos de capítulos são escritos em letras minúsculas e os títulos de livros, com as primeiras letras maiúsculas. Sempre mencionar as páginas consultadas; mas, quando se refere a múltiplos grupos de páginas num livro, somente colocar o número total de páginas]

#### **Quando os autores de capítulos do livro não são os Editores**

- George L.W. 2002. Listeriosis, p.946-949. In: Smith B.P. (Ed.), *Large Animal Internal Medicine.* 3rd ed. Mosby, St Louis. 8

- López A. 2007. Respiratory system, p.463-542. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.
- Maxie M.G. & Robinson W.S.F. 2007. Cardiovascular system, p.1-105. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.3. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.

### **Dissertação de Mestrado (ou Tese, em caso de Doutorado)**

- Oliveira T.M.F.S. 2004. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, em soros de cães do Município de Jaboticabal, área não-endêmica para a doença. Dissertação de Mestrado em Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 45p.

### **Resumo em Congresso**

- Bianchi S.P., Correa R.K.R., Villa-Lobos W.O.R., Ferreira R.R. & Machado M.L.S. 2008. Atendimentos realizados no ano de 2007 no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. Anais 35o Conbravet, Gramado, RS, p.50. (Resumo)

### **Citação indireta**

- Dost G. 1980. Salinomycinein neues Polyäther-antibiotikum als Wachstumsförderer bei Schweinen. Landwirtsch. Forsch. Sonderheft 37, Kongressband, Braunschweig. (Apud Ganter et al. 1995)
- Ganter M., Kieckhofer H. M. & Kucza A. 1995. Intoxicação aguda por salinomicina/tiamulin em suínos. Hora Vet. 15(85):12-16.

[Observe que o trabalho onde o autor recolheu a informação secundária (Ganter et al. 1995), deve ser citado, como acima, por completo na lista das Referências]

### **Comunicação pessoal**

- Peixoto P.V. 2009. Comunicação pessoal (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

[Observe que, quando Peixoto não for um dos autores do trabalho, ele deve ser citado no próprio texto, como: "... (Peixoto 2009)" e referenciado, como acima, na lista das Referências; mas quando Peixoto for um dos autores do trabalho, o nome dele deve-ser colocado somente no texto, como: "... (Peixoto, comunicação pessoal)". ....]

### **Legendas das Figuras**

- Fig.1. Marcação positiva acentuada vermelha em neurônios da medula espinhal. Recuperação antigênica com calor e tampão citrato. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.20x.
- Fig.2. Marcação positiva vermelha em corpúsculos de inclusão viral no pericário (seta maior) e axônio (seta menor) de célula de Purkinje do cerebelo. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. 9
- Fig. 3. Marcação acentuada de antígeno viral na forma de agregado de grânulos vermelhos em neurônios na medula espinhal. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.40x.
- Fig.4. Identificação positiva de corpúsculo de inclusão viral única em neurônio fortemente marcado na medula espinhal. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.40x.

## Os Quadros

(O termo Quadro é usado, pois é mais abrangente do que o termo Tabela)

<b>Quadro 1. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo policlonal (Chemicon #5199) usando três recuperações antigênicas</b>						
Protease XIV				Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)
Caso no.	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	2a	2	2	2	3	3
2	2	2	2	2	3	1b
3	2	2	2	2	3c	3
4	1	1	1	1	3	3
5	3	1	2	1	3	3
6d	0e	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Marcação moderada, <sup>b</sup> marcação leve, <sup>c</sup> marcação acentuada, <sup>d</sup> controle negativo, e <sup>e</sup> ausência de marcação.

(Note que os títulos dos Quadros não têm ponto no final, como aliás nenhum título)

<b>Quadro 2. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal GeneTex (GTX 21002) usando três recuperações antigênicas</b>						
Protease XIV				Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)
Caso	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	1a	1	1	1	0b	0
2	1	1	1	1	0	0
3	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	0	0
6c	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Marcação leve, <sup>b</sup> ausência de marcação, <sup>c</sup> controle negativo.

<b>Quadro 3. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal Biodesign (C86307M) usando três recuperações antigênicas</b>						
Protease XIV				Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)
Caso no.	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1b	1	1	1	1	0a	0
2	0	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0
6c	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Ausência de marcação, <sup>b</sup> marcação leve, <sup>c</sup> controle negativo.

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4