

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE RETROSPECTIVA DE EXAMES SOROLÓGICOS DE
LEPTOSPIROSE ANIMAL EXECUTADOS NO LABORATÓRIO DE
LEPTOSPIROSE E BRUCELOSE DA UNESP, CÂMPUS JABOTICABAL, DE
2007 A 2015**

Maria Eduarda Chiaradia Furquim
Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE RETROSPECTIVA DE EXAMES SOROLÓGICOS DE
LEPTOSPIROSE ANIMAL EXECUTADOS NO LABORATÓRIO DE
LEPTOSPIROSE E BRUCELOSE DA UNESP, CÂMPUS JABOTICABAL, DE
2007 A 2015**

Maria Eduarda Chiaradia Furquim

Orientador: Prof. Dr. Luis Antonio Mathias

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

2016

F991a Furquim, Maria Eduarda Chiaradia
Análise retrospectiva de exames sorológicos de leptospirose animal executados no Laboratório de Leptospirose e Brucelose da Unesp, câmpus Jaboticabal, de 2007 a 2015 / Maria Eduarda Chiaradia Furquim. -- Jaboticabal, 2016
xii, 83 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Luís Antonio Mathias
Banca examinadora: Anna Monteiro Correia Lima, Luiz Augusto do Amaral

Bibliografia

1. *Leptospira* spp. 2. Soroaglutinação microscópica. 3. Epidemiologia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.986.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

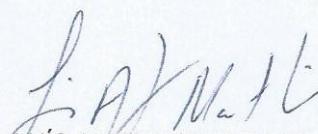
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE RETROSPECTIVA DE EXAMES SOROLÓGICOS DE LEPTOSPIROSE ANIMAL EXECUTADOS NO LABORATÓRIO DE LEPTOSPIROSE E BRUCELOSE DA UNESP, CÂMPUS JABOTICABAL, DE 2007 E 2015

AUTORA: MARIA EDUARDA CHIARADIA FURQUIM

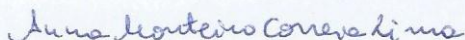
ORIENTADOR: LUÍS ANTONIO MATHIAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



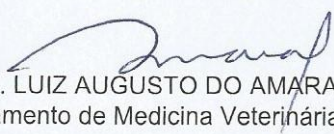
Prof. Dr. LUÍS ANTONIO MATHIAS

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ANNA MONTEIRO CORREIA LIMA

Faculdade de Medicina Veterinária / UFU - Uberlândia/MG



Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de novembro de 2016

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Maria Eduarda Chiaradia Furquim – nascida em 29 de novembro de 1990, no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, filha de Ligia Donizetti do Carmo Nascimento Furquim e Antonio Celso Furquim. Ingressou em fevereiro de 2009 na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Câmpus Umuarama, concluindo em dezembro de 2013. Realizou iniciação científica no período de 2010 a 2011, sobre a “Origem e inervação do nervo fibular comum na perna de ovinos sem raça definida”, sob orientação do Prof. Dr. Hudson Armando Nunes Canabrava. No período de 2011 a 2013, realizou iniciação científica sobre a “Soroepidemiologia da brucelose em equídeos abatidos em frigorífico exportador”, sob a orientação da Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima. Vencedora do II Encontro de Iniciação Científica e Tecnológicas da UFU na área de Agrárias com o trabalho “Investigação da brucelose em equídeos abatidos em frigorífico exportador”. Em agosto de 2014, ingressou no curso de mestrado em Medicina Veterinária na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Luis Antonio Mathias.

Dedico

À minha avó Cici, meu exemplo de mulher, sempre amorosa e alegre. Sei que estaria muito feliz com mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ligia e Antônio Celso, pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Sei que me ausentei em muitos momentos importantes durante esses anos e que a saudade, em alguns momentos, foi insuportável, mas saibam que vocês são o principal motivo de todo meu esforço e dedicação.

À minha irmã Daniela, por todo amor, pelo constante entusiasmo e por me dar as minhas maiores alegrias, meu amado Augusto e minha princesa, que ainda não nasceu, mas por quem já tenho um amor imenso.

À Marcela, por todo carinho, por todas as conversas, pelos momentos em que me deu forças, me alegrou e se fez presente.

Ao meu orientador, Luis Antônio Mathias, pela orientação, ensinamentos e oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Renata Ferreira dos Santos, pela amizade e paciência, por me ajudar nos momentos em que me senti perdida e na confecção dos mapas e pelas conversas sempre muito engrandecedoras, sem as quais não teria definido o tema desta dissertação.

Às “Bonafas”, em especial a Marilaine, pelo carinho, por me acolherem e se tornarem minha família paulista.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelos ensinamentos e pela atenção dispensada no decorrer do mestrado. Em especial ao técnico Nivaldo Aparecido de Assis, por toda ajuda, por estar sempre presente e disposto a ajudar, com muita paciência e um sorriso no rosto.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus familiares, por todo apoio e carinho.

Aos amigos feitos em Jaboticabal - SP, por toda a amizade, pelas conversas, pelos encontros sempre muito alegres e divertidos, e por me acolherem neste grupo tão querido e especial.

A todos aqueles que estiveram presente durante este período que, embora não nomeados individualmente, sempre me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO UM – Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	2
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. AGENTE ETIOLÓGICO	3
3.2. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA	4
3.3. LEPTOSPIROSE ANIMAL.....	7
3.4. LEPTOSPIROSE HUMANA.....	10
3.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO DOIS - Anticorpos contra <i>Leptospira</i> spp. em amostras de soro sanguíneo bovino analisadas no período de 2007 a 2015 provenientes de diversos estados brasileiros.....	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3. RESULTADOS	26
4. DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO TRÊS - Anticorpos contra <i>Leptospira</i> spp. em amostras de soro canino, equino e outras espécies analisadas no período de 2007 a 2015 provenientes de diversos estados brasileiros.....	43
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46

3. RESULTADOS	47
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO QUATRO – Considerações Finais	63
ANEXO 1.....	64
ANEXO 2.....	68
ANEXO 3.....	71
ANEXO 4.....	72



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Análise retrospectiva de exames sorológicos para leptospirose animal executados no Laboratório de Brucelose e Leptospirose da Unesp – Jaboticabal entre os anos de 2005 e 2015**", protocolo nº 22828/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luís Antonio Mathias, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de dezembro de 2015.

Vigência do Projeto	01/01/2016 a 31/08/2016
Espécie / Linhagem	Bovino, Canino, Equino, Caprino, Ovino e Suíno
Nº de animais	
Peso / Idade	Idade adulta
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Banco de dados do Laboratório de Leptospirose e Brucelose

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2015.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

ANÁLISE RETROSPECTIVA DE EXAMES SOROLÓGICOS DE LEPTOSPIROSE ANIMAL EXECUTADOS NO LABORATÓRIO DE LEPTOSPIROSE E BRUCELOSE DA UNESP, CÂMPUS JABOTICABAL, DE 2007 A 2015

RESUMO – Com o intuito avaliar a frequência de aglutinas anti-*Leptospira* dentre as amostras analisadas no Laboratório de Brucelose e Leptospirose da Unesp, Câmpus Jaboticabal, realizou-se uma investigação retrospectiva dos resultados de exames sorológicos para diagnóstico de leptospirose entre os anos de 2007 e 2015. Neste período foram recebidas 24.483 amostras bovinas, 1.855 amostras equinas, 819 amostras caninas, 532 amostras ovinas, 230 amostras caprinas e 123 amostras suínas. As amostras bovinas provinham de 21 estados brasileiros e a frequência de reagentes foi de 35,30% (IC 95%: 34,70% - 35,90%), sendo o sorogrupo Sejroe o mais relevante. Das amostras caninas, a maioria foi originária do Estado de São Paulo e a frequência de amostras reagentes foi de 23,93% (IC 95%: 21,01% - 26,85%), sendo o sorogrupo Canicola o mais relevante. Nos equinos, a frequência de amostras reagentes encontrada foi de 46,95% (IC 95%: 44,68% - 49,23%), sendo o sorogrupo Icterohaemorrhagiae o mais importante nesta espécie. A frequência de reagentes encontrada nas amostras das espécies ovina, caprina e suína foi 7,32% (IC 95%: 5,12% - 9,55%), 1,30% (IC 95%: 0,0044% - 3,764%) e 6,03% (IC 95%: 1,70% - 10,37%), respectivamente, e o sorogrupo de maior ocorrência nesses animais foi Icterohaemorrhagiae. Tais resultados permitem confirmar o caráter endêmico da leptospirose em território brasileiro, bem como evidenciar a importância dos hospedeiros de manutenção do agente na disseminação da doença.

Palavras-chave: *Leptospira* spp., Teste de soroaglutinação microscópica (MAT), Epidemiologia.

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF SEROLOGIC LEPTOSPIROSIS TESTS PERFORMED AT THE LEPTOSPIROSIS AND BRUCELLOSIS LABORATORY OF UNESP, JABOTICABAL CAMPUS, BETWEEN 2007 AND 2015

ABSTRACT - In order to evaluate the frequency of anti-*Leptospira* agglutinins among the samples analyzed in the Leptospirosis and Brucellosis Laboratory, Unesp, Jaboticabal Campus, a retrospective investigation of the results of serological tests for leptospirosis between the years 2007 and 2015 was performed. During this period, 24,483 bovine samples, 1,855 equine samples, 819 canine samples, 532 sheep samples, 230 goats samples and 123 swine samples were received. Bovine samples came from 21 Brazilian states and the frequency of reactors was 35.30% (95% CI: 34.70% - 35.90%) and serogroup Sejroe was the most relevant. Of canine samples, most were originally from the state of São Paulo and the frequency of reacting samples was 23.93% (95% CI: 21.01% - 26.85%), the serogroup Canicola was the most relevant. In horses, the frequency of reagent samples was found to be 46.95% (95% CI: 44.68% - 49.23%), the serogroup Icterohaemorrhagiae was the most important in this species. The frequency of reactors among of sheep, goats and swine samples was 7.32% (95% CI: 5.12% - 9.55%), 1.30% (95% CI: 0.0044% - 3.764%) and 6.03% (95% CI: 1.70% - 10.37%), respectively, and the serogroup most frequent in these animals was Icterohaemorrhagiae. These results confirm the endemicity of leptospirosis in Brazil, as well as highlight the importance of the agent maintenance hosts in the dissemination of the disease.

Key words: *Leptospira* spp.; Microscopic Agglutination Test (MAT); Epidemiology.

CAPÍTULO UM – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose relatada mundialmente, causada por bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira*, composto por organismos saprófitos e patogênicos, que possuem grande capacidade de infectar diversos hospedeiros mamíferos, bem como sobreviver em ambientes diversos.

Tais bactérias possuem hospedeiros de predileção, chamados de hospedeiros de manutenção, entretanto também podem infectar diversas outras espécies animais denominadas hospedeiros acidentais. Como exemplo, cita-se a *Leptospira interrogans* sorovariedade Icterohaemorrhagiae, cujos hospedeiros de manutenção são roedores sinantrópicos, mas é considerada o principal agente causador da doença na espécie equina, seu hospedeiro acidental.

A *Leptospira* é responsável por colonizar diversos órgãos, principalmente os rins, onde estabelece uma doença renal crônica que leva a excreção intermitente deste agente pela urina por tempo indeterminado. Com isso, os animais infectados tornam-se portadores renais e fontes de contaminação ambiental e de infecção para outros animais, bem como para o ser humano. Entretanto, é comum que a leptospirose se apresente de forma assintomática, dificultando a identificação dos animais infectados.

Uma vez que o controle da leptospirose é realizado por meio da redução da prevalência das sorovariedades mantidas pela população animal, o conhecimento dos sorogrupos e/ou sorovariedades presentes em uma determinada região ou rebanho é essencial para entender a epidemiologia da doença e para direcionar as medidas profiláticas, pela vacinação sistemática do rebanho, pela segregação dos animais doentes ou pelo controle de roedores.

No Brasil, a leptospirose já foi relatada em todos os estados da federação, e sua notificação é obrigatória tanto em casos humanos como em casos animais, porém existe uma subnotificação destes. Na produção animal, somente em granjas suínas certificadas para o fornecimento de reprodutores é obrigatória a apresentação de testes sorológicos negativos ou certificados de vacinação para a doença. Nos demais tipos de criação animal (bovina, ovina, caprina, canina), a vacinação fica a critério dos proprietários. Desta forma,

nota-se que não existe nenhum sistema efetivo e unificado para o controle da leptospirose no território nacional.

Com isso, os estudos epidemiológicos são de extrema importância para a percepção da distribuição espacial da leptospirose, bem como para o conhecimento das sorovariedades mais frequentes em diversas regiões do país para que sejam tomadas as medidas necessárias para o controle da doença, visando minimizar a sua disseminação nas populações humana e animais.

2.OBJETIVO GERAL

Avaliar a frequência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. de exames de soroprecipitação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose animal, realizados na rotina do Laboratório de Brucelose e Leptospirose entre os anos de 2007 e 2015, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a frequência de reagentes contra *Leptospira* spp. nos resultados da MAT
- Estimar a sorovariedade de maior ocorrência nos anos analisados
- Verificar o sorogrupo de maior ocorrência nas espécies analisadas
- Avaliar a associação entre os resultados e alguns aspectos epidemiológicos

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. AGENTE ETIOLÓGICO

A leptospirose é uma doença causada por bactérias espiroquetas da família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*, composto por microrganismos saprófitos (*Leptospira bliflexa sensu lato*) e patogênicos (*Leptospira interrogans sensu lato*), que demonstram grande capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros e sobrevivem tanto em mamíferos marinhos como em mamíferos terrestres (FAINE et al., 1999; CAMERON, 2015)

São espiroquetas espiraladas, com 0,1 µm de diâmetro e 6 µm a 20 µm de comprimento, cujas extremidades apresentam-se em forma de gancho. São bactérias que possuem rápida mobilidade translacional, e sua ultraestrutura é similar à das bactérias Gram-negativas, que possuem uma membrana externa de lipopolissacarídeo (LPS), uma membrana interna e uma membrana intermediária localizada no espaço periplasmático composta por peptoglicanos (CAMERON, 2015).

São bactérias aeróbias obrigatórias e se multiplicam em temperaturas entre 28°C e 30°C, em um pH que varia de 7,2 a 7,6. O cultivo é realizado em meios de cultura tais como Fletcher, Noguchi, Stuart e EMJH (Ellinghausen-McCullough-Jonhson-Harris), sendo este último o mais utilizado, e para evitar a presença de contaminantes de amostras clínicas, o meio é acrescido de 5-fluoracil (LEVETT, 2001; CAMERON, 2015).

A sobrevivência e a disseminação destas bactérias dependem de condições ideais, como solo úmido, água estagnada neutra ou levemente alcalina com temperatura de 22°C ou mais, resistindo nessas condições por muitas semanas (SALOMÃO; PIGNATARI, 2004). Em água parada, este microrganismo sobrevive por mais tempo do que em água corrente, porém já foi observada a sobrevivência por 15 dias em água corrente e sobrevivência de aproximadamente de 30 minutos em solo seco ao ar (RADOSITITS et al., 2002).

A classificação dos integrantes do gênero *Leptospira* pode ser realizada tanto por meios sorológicos como geneticamente e, embora a classificação sorológica ainda seja a mais utilizada, existe uma tendência de utilização futura da classificação genética. No entanto, ambas as classificações reconhecem a existência de bactérias patogênicas e saprófitas neste gênero (LEVETT, 2001).

Todas as espécies de *Leptospira* são agrupadas de acordo com o LPS exposto em sua membrana externa, o qual se apresenta estruturalmente diferente entre os membros deste gênero, determinando uma grande variedade antigênica entre as sorovariedades. As sorovariedades que apresentam sobreposição de determinantes antigênicos são agrupadas em grupos maiores, os sorogrupos (EVANGELISTA; COBURN, 2010). Apesar de essa classificação não possuir nenhuma importância taxonômica, tais agrupamentos mostram-se úteis para o diagnóstico sorológico e para o entendimento dos aspectos epidemiológicos tanto regionais como populacionais (LEVETT, 2015).

Em relação à classificação fenotípica, as genomoespécies são compostas por todas as sorovariedades pertencentes aos grupos *Leptospira interrogans* sensu lato e *Letospira biflexa* sensu lato. Atualmente são descritas 21 espécies de *Leptospira*, que são agrupadas em patogênicas, intermediárias e não patogênicas, porém algumas dessas espécies podem se comportar tanto como patogênicas como não patogênicas (LEVETT, 2015).

3.2. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é uma zoonose cosmopolita, sendo relatada em todas as espécies mamíferas estudadas, e os portadores renais são os componentes centrais para a persistência e epidemiologia da doença (ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010).

A primeira descrição da leptospirose ocorreu em 1886, quando o médico Adolf Weil descreveu um tipo de icterícia acompanhada de esplenomegalia, disfunção renal, conjuntivite, erupções cutâneas (doença de Weil) e associada a atividades ao ar livre em que existia contato com a água, sendo frequente em agricultores e mineradores (ADLER, 2015).

O primeiro relato a respeito do agente causador da leptospirose ocorreu em 1907, quando foram identificadas espiroquetas pela coloração de Levaditi, método que utiliza a deposição de sais de prata, a partir de tecido renal de um paciente que faleceu devido a febre amarela. Tais microrganismos foram então chamados de *Spirochaeta interrogans*, devido a sua semelhança a um ponto de interrogação (STIMSON, 1907).

Em 1916, Inada et al. realizaram o primeiro isolamento do agente causador da doença de Weil, a qual se apresentava de forma endêmica no Japão. Para isso, injetaram intraperitonealmente o sangue de pacientes com a doença em porquinhos-da-índia, que manifestaram sinais clínicos típicos da leptospirose aguda. Posteriormente, o agente foi

isolado a partir do fígado desses animais e estabeleceu-se que a espiroqueta causadora da doença seria denominada *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*

A infecção, tanto de animais suscetíveis como do ser humano, ocorre por contato direto e indireto com urina ou tecidos de animais infectados. A principal porta de entrada da *Leptospira* são abrasões e/ou cortes na pele ou pela conjuntiva, entretanto, a penetração também pode ocorrer por meio de pele intacta após a imersão prolongada na água (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003).

Os animais podem atuar como hospedeiros de manutenção de algumas sorovariedades e como hospedeiros acidentais de outras, e, nesses casos, a infecção pode causar uma doença severa e até mesmo fatal. Mundialmente já foi demonstrado que a maioria dos mamíferos terrestres e aquáticos, atuam como reservatórios de *Leptospira* (LEVETT, 2001; ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010).

A leptospirose é mantida na natureza por meio da infecção crônica dos túbulos renais de seus hospedeiros. Desta forma, o agente é excretado com a urina, resultando na contaminação de solos, rios e nascentes. Tais microrganismos não sobrevivem em urinas ácidas, mas permanecem viáveis em urina alcalina. Portanto, animais herbívoros ou cuja dieta leva à produção de urina alcalina possuem maior importância na disseminação da doença (LEVETT, 2001; ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010).

Em trabalho realizado por Yan et al. (2010), equinos foram infectados experimentalmente por *Leptospira interrogans* sorovar Kinnenwicki e apresentaram leptospirose de 2 a 6 dias após a infecção e leptospiúria 4 semanas pós-infecção, demonstrando a importância dos portadores renais na disseminação da doença.

No Brasil, os primeiros relatos da leptospirose ocorreram em 1917 (McDOWEL, 1917; ARAGÃO, 1917). No ano de 1950, foi isolada a sorovariedade Icterohaemorrhagiae de amostras de pacientes humanos (GOMES et al., 1950), dando início a uma intensificação nos estudos abordando a leptospirose. Já no ano de 1963, Magaldi publicou um estudo sobre a incidência, prevalência e distribuição da doença no país, alertando para sua importância (apud CARDOSO, 2015)

Em 1970, Santa Rosa et al. publicaram um estudo retrospectivo dos exames para diagnóstico de leptospirose realizados pelo Instituto Biológico de São Paulo no período de 1960 a 1968. Neste intervalo foram examinadas 21.263 amostras provenientes de diferentes espécies animais e amostras humanas. Dos dados, 23,6% das amostras bovinas foram positivas, sendo a sorovariedade Wolffi a mais frequente; 22,8% das amostras equinas foram positivas, sendo a sorovariedade Pomona a mais frequente; 19,5% das

amostras suínas foram positivas, sendo a sorovariedade Pomona a mais frequente; 5,8% das amostras humanas foram positivas, sendo a sorovariedade Icterohaemorrhagiae a mais frequente.

Em estudo retrospectivo realizado por Fávero et al. (2002) em 31.325 amostras de soro bovino provenientes de 21 estados brasileiros, a frequência de aglutininas anti-leptospira foi de 37,94%, sendo a sorovariedade Hardjo a mais reativa dentre as utilizadas na MAT. Já em estudos realizados por Araújo et al. (2005), Lage et al. (2007); Oliveira et al. (2009) e Nicolino et al. (2014), a frequência de amostras reagentes à sorovariedade Hardjo variou de 14,95% a 23,7%.

Langoni et al. (2000), ao pesquisar 2.761 amostras de soro bovino provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, encontraram uma frequência de 70,59% para a sorovariedade Wolffi. Já em trabalhos realizados por Araújo et al. (2005), Castro et al. (2008), Oliveira et al. (2009) e Silva et al. (2012), foram encontradas frequências que variaram de 0,329% a 3,3% e 0,54% a 2,8% para as sorovarietades Tarassovi e Pomona, respectivamente.

No Brasil, as investigações que obtiveram sucesso no isolamento da *Leptospira* em pequenos ruminantes são restritas, e os relatos tanto na espécie ovina quanto na caprina restringem-se à frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em animais aparentemente saudáveis. As frequências encontradas em estudos de prevalência em ovinos variam de 0,70% a 34,60% e em caprinos variam de 3,40% a 31,30% (apud SILVA, 2015).

Em estudo realizado por Santos (2014), foram avaliadas 767 amostras de soro de equinos abatidos no Estado do Rio Grande do Sul, e a frequência amostras reagentes foi de 89,57% na MAT, sendo as sorovarietades mais frequentes Patoc (56,71%) e Bratislava (50,07%). Já em estudo realizado por Furquim, Santos e Mathias (2015) em 107 amostras de soro equino, 92,52% foram reagentes na MAT, sendo a sorovariedade Icterohaemorrhagiae (71,96%) a mais frequente.

Em relação à espécie suína, a leptospirose está incluída no Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS) do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), em que as granjas de suídeos certificadas deverão ser livres ou controladas para a doença e, segundo as Normas para Certificação de Granjas de Reprodutores Suídeos, as granjas de reprodutores devem apresentar a cada seis meses os resultados da MAT para as seguintes sorovarietades: Canicola, Grippothyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Bratislava (BRASIL, 2002).

Azevedo et al. (2006) analisaram amostras de soro de 164 fêmeas de uma granja suína localizada no Estado de São Paulo e encontraram frequência de 16,5% de amostras positivas, sendo as sorovarietades Hardjo (54,2%), Shermani (16,6%), Bratislava (12,5%), Autumnalis (12,5%) e Icterohaemorrhagiae (4,2%).

Já em relação à espécie canina, considera-se que no Brasil as sorovarietades de maior importância para a doença nesses animais são Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Pyrogenes e Hardjo. Em pesquisa realizada em 151 amostras de soro canino, 35,1% foram positivas na MAT, sendo as sorovarietades Copenhageni (23,73%), Djasiman (18,64%) e Icterohaemorrhagiae (16,95%) as mais frequentes (LANGONI et al., 2015).

3.3. LEPTOSPIROSE ANIMAL

A leptospirose é uma doença sistêmica caracterizada por febre, insuficiência renal e hepática, manifestações pulmonares e falhas reprodutivas (ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010).

A entrada da *Leptospira* no organismo ocorre por meio de pequenos cortes ou abrasões na pele, por membranas mucosas ou pela pele molhada com abertura de poros. Um ou dois dias após a infecção, é estabelecida uma bacteremia, que acaba com o surgimento de anticorpos, que passam a ser detectáveis 10 a 14 dias pós-infecção. Durante a bacteremia, os microrganismos podem ser isolados do sangue e de diferentes órgãos (ELLIS, 2015).

Após a infecção e o período de bacteremia, ocorre a produção de imunoglobulinas (Ig) M e dias depois surgem as imunoglobulinas (Ig) G com ação neutralizante. Embora a aglutinação dos anticorpos ajude na resolução da bacteremia, tal processo é ineficaz para a completa eliminação dos microrganismos dos túbulos renais. Em hospedeiros não adaptados, a *Leptospira* pode ser eliminada pela urina por um período de 10 dias a 4 meses (DIVERS; PEEK, 2008).

Ao atingir um número crítico na corrente sanguínea e nos tecidos, as lesões ocasionadas pela ação indefinida das toxinas da *Leptospira* ou por componentes celulares tóxicos, levam à manifestação dos sinais clínicos. A primeira lesão a surgir são danos endoteliais de pequenos vasos sanguíneos, que levam a uma isquemia localizada em diversos órgãos, resultando em necrose dos túbulos renais, danos hepatocelulares e

pulmonares, meningite, miosite e placentite. Hemorragias e icterícia ocorrem em casos severos, bem como deficiência plaquetária (ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010).

A *Leptospira* coloniza a superfície das células epiteliais dos túbulos renais proximais e pode ser excretada intermitente ou continuamente com a urina. Os animais infectados podem apresentar uma concentração bacteriana de até 10^8 /mL na urina, e a duração, bem como a intensidade, da excreção urinária varia entre as espécies, entre os animais e com o tipo de sorovariedade infectante (ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010; ELLIS, 2015).

A leptospirose já foi relatada em todas as regiões do mundo (com exceção dos polos), bem como em todas as espécies animais estudadas. Dentre as espécies domésticas, os equinos apresentam-se como os mais susceptíveis à infecção pela *Leptospira* e por uma ampla gama de sorovarietades, enquanto a infecção em felinos é rara. As infecções pelos sorogrupos Pomona ou Icterohaemorrhagiae são responsáveis por causar uma doença hemolítica, hemoglobinúria, icterícia e até mesmo levar a óbito. Nos cães, os danos renais são causados particularmente pela sorovariedade Canicola (ELLIS, 2015)

Os bovinos são reservatórios naturais da sorovariedade Hardjo, sendo a *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjobovis a mais comum entre esses animais, enquanto a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno também é encontrada em algumas partes do mundo. Ambas as sorovarietades possuem a habilidade de colonizar e persistir no trato reprodutor de vacas e touros, sugerindo a possibilidade da transmissão venérea. Em vacas prenhes, o agente pode ser encontrado no útero, levando a abortamento, natimortalidade e doença neonatal. A fase aguda da infecção geralmente apresenta-se de forma subclínica, com exceção de vacas lactantes, em que a agalactia pode ocorrer (ELLIS, 2015).

Várias outras sorovarietades também são responsáveis por infectar bovinos e, apesar de incomum, nos casos graves da doença os microrganismos dos sorogrupos Pomona, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa são os principais responsáveis. Nesses casos, os sinais encontrados são piroxia, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, ocasionalmente meningite e óbito. Em vacas lactantes, as infecções incidentais usualmente provocam o aparecimento de pequenas quantidades de sangue no leite (ELLIS, 2015).

A leptospirose em pequenos ruminantes apresenta-se de maneira similar à dos bovinos, podendo ocorrer nas formas crônica, aguda ou inaparente. Na forma aguda, após período de incubação, os animais podem apresentar anorexia, depressão, dificuldade respiratória e febre, assim como hemoglobinemia e hemoglobinúria. Na forma crônica,

abortamentos e natimortalidade são as manifestações mais frequentes. Em caprinos, também pode haver diminuição da produção de leite e agalactia (HIGINO; AZEVEDO, 2014).

Em éguas gestantes é comum o relato de reabsorção embrionária precoce, abortos no terço final da gestação ou nascimento de potros prematuros e fracos (THOMASSIAN, 2005). Em casos de aborto, o feto morre de 24 a 48 horas antes de ser expelido, o que impossibilita o isolamento do agente etiológico nos tecidos, já que estes se encontram em estado de autólise (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Já potros recém-nascidos, infectados ainda no útero materno, podem apresentar sinais mais graves e morrer (PIRES NETO; HESSE; OLIVEIRA, 2005).

Uma manifestação crônica da leptospirose comum em cavalos é a ocorrência de uveíte recorrente (ROHRBACH et al., 2005), caracterizada por inflamações intraoculares desenvolvidas semanas ou meses após o quadro de infecção inicial (PIRES NETO; HESSE; OLIVEIRA, 2005). Segundo Radostits et al. (2002), a uveíte é uma complicação tardia da leptospirose, e o animal pode apresentar sinais como fotofobia, lacrimejamento, conjuntivite, ceratite, hipópio e iridociclite, meses ou anos após a infecção. Em estágios iniciais, ocorre uveíte anterior, e repetidas crises lesionam estruturas como córnea, cristalino, corpo vítreo, retina e nervo óptico.

No Brasil, o decreto nº 5.741, do dia 30 de março de 2006, inciso V do artigo 37, instituiu o Sistema de Informação Zoossanitária (SIZ), que engloba o Sistema Brasileiro de Vigilância e Emergências Veterinárias (SisBraVet) e é responsável por coletar dados sobre a ocorrência das doenças animais e divulgar informações zoossanitárias. O SIZ é alimentado pelas informações fornecidas pelo Sistema Veterinário Oficial e pela Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que recebem a notificação por meio do Formulário de Notificação de Suspeita ou Ocorrência de Doenças Animais (BRASIL, 2013).

As doenças de notificação obrigatória estão listadas na Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013, e a leptospirose encontra-se na categoria 4, cujos casos confirmados devem ser notificados mensalmente. Nesta categoria, as doenças não são passíveis de aplicação de medidas sanitárias obrigatórias pelo Serviço Oficial Veterinário, mas devem ser monitoradas por sua importância para a saúde pública e animal, bem como para preencher requisitos de certificação sanitária (BRASIL, 2013).

3.4. LEPTOSPIROSE HUMANA

Dados coletados pela Sociedade Internacional de Leptospirose mostram que a incidência anual da doença está em torno de 350 mil a 500 mil casos e que ainda é uma doença subestimada pela grande maioria dos países que não possuem um sistema de notificação ou a notificação não é obrigatória (AHMED et al., 2012).

No Brasil, a leptospirose está na lista de doenças de notificação compulsória, de acordo com a Portaria GM/MS nº 204, de 17 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016a), e em 2015, somente 4.318 casos de leptospirose humana foram confirmados no país (BRASIL, 2016b). Entretanto, em pesquisa realizada por Castro et al. (2011), evidenciou-se que a notificação está aquém da realidade, uma vez que, ao realizar o levantamento dos casos confirmados pela MAT tanto Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia como em laboratórios particulares do município, observou-se que o número de resultados positivos foi maior do que o apontado pelo Sistema de Informação e Agravos de Notificação (SINAN) para o mesmo período. Acredita-se que tal diferença possa ter ocorrido pela semelhança da sintomatologia da leptospirose humana com a de outras doenças tropicais, como a dengue, levando assim a uma subnotificação.

Uma vez que a leptospirose provoca múltiplos sintomas inespecíficos, o seu diagnóstico é complexo, e por muitas vezes esta doença é ignorada ou mal diagnosticada, ficando a suspeita somente nos casos em que existem manifestações clássicas da doença (SEGURA et al., 2005).

O risco de infecção depende da prevalência da leptospirose na região, bem como da frequência e do grau de exposição. Em sua maioria, as infecções podem ser prevenidas pelo uso de equipamentos de proteção individuais, tais como botas de borrachas, luvas e óculos protetores (HAAKE; LEVETT, 2015). A infecção humana está ligada principalmente a atividades ocupacionais (como agricultura e produção animal), atividades recreacionais ou contato com urina de animais infectados, bem como pelo contato com solo e água contaminada (ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010). Em estudos como os realizados por Ochoa et al. (2001) e Nájera et al. (2005), a prevalência encontrada variou de 13,1% a 22,4%, e as pessoas testadas exerciam atividades relacionadas a bovinocultura, equinocultura, suinocultura, agricultura e abate de animais.

Os sintomas variam em razão da severidade da doença, apresentando-se desde uma doença febril leve e autolimitante até uma doença que pode levar a óbito. O período

de incubação da leptospirose no ser humano é de sete a 15 dias, podendo se estender até 30 dias. Sua forma mais comum apresenta uma síndrome febril sem icterícia, mas em 5 a 10% dos casos há a presença de icterícia, manifestações hemorrágicas e insuficiência renal (doença de Weil), considerada a forma mais grave e potencialmente fatal, com letalidade de 5 a 40%. Uma vez que diversos órgãos podem ser acometidos devido ao caráter sistêmico da leptospirose, os sinais apresentados são variados e são frequentemente confundidos com aqueles causados por outras doenças como influenza, dengue, malária e chikungunya (CIMERMAN; CIMERMAN, 2003; SALOMÃO; PIGNATARI, 2004; HAAKE; LEVETT, 2015).

Um sinal característico que auxilia na identificação da leptospirose é o derrame conjuntival (dilatação dos vasos conjuntivais com ausência de exsudato purulento), uma vez que é incomum em outras doenças. Entre os sinais oculares, também se notam hemorragias subconjuntivais e icterícia (HAAKE; LEVETT, 2015).

3.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leptospirose é necessário para a confirmação de casos clínicos, e também em outras situações, como a avaliação da infecção e/ou o estado imune de um rebanho, para efeito de controle ou redução da prevalência da doença em um rebanho ou no território nacional; estudos epidemiológicos; bem como para a avaliação do estado de infecção individual de animais utilizados no comércio internacional ou que serão introduzidos em um rebanho não infectado (ELLIS, 2015). Os sinais clínicos da leptospirose nem sempre permitem um diagnóstico preciso, uma vez que não são específicos e podem ser confundidos com outros sinais produzidos por outros patógenos, tornando o diagnóstico clínico um método pouco apropriado (FLÓREZ et al., 2006).

No diagnóstico laboratorial clínico, em casos mais severos, os leucócitos sofrem um desvio para a esquerda, assim como em casos de dengue, e também se nota uma trombocitopenia acentuada. Desta forma, pela natureza não específica dos resultados do laboratório clínico, pode-se apenas sugerir o diagnóstico de leptospirose, e para que seja confirmado são necessários outros testes específicos (LEVETT, 2001).

Existe uma grande variedade de testes de diagnóstico de leptospirose, tais como a soroaglutinação microscópica (MAT), que detecta anticorpos específicos; a inibição da hemaglutinação (HI) ou o ensaio imunoenzimático (ELISA). A *Leptospira* e os seus componentes também podem ser detectados na urina ou em tecidos por meio de cultura,

microscopia de campo escuro, imuno-histoquímica ou PCR (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

A MAT é o teste mais utilizado para o diagnóstico da leptospirose, porém não é possível discriminar anticorpos resultantes da infecção ou da vacinação. O critério mínimo da MAT é o emprego de antígenos que sejam representativos dos sorogrupos existentes em determinadas regiões ou no país onde o teste está sendo empregado. É um teste trabalhoso, uma vez que para sua realização são necessárias culturas vivas de *Leptospira*, e sua sensibilidade depende da etapa de infecção em que o animal se encontra. O critério utilizado para indicar uma infecção atual por *Leptospira* é o título superior a 400 na presença de sinais clínicos e o histórico do animal. Entretanto, a MAT possui certas limitações para o diagnóstico de infecções crônicas, tanto em casos de aborto como na identificação de portadores renais, em que os títulos estão caindo ou estáticos (FAINE et al., 1999; ELLIS, 2015).

A detecção da leptospirose por meio do isolamento deste microrganismo constitui um recurso definitivo para o diagnóstico, porém a velocidade de multiplicação das cepas de *Leptospira* e o longo período de incubação antes do isolamento da bactéria tornam-se um empecilho para a utilização deste método. Os materiais utilizados para o isolamento da bactéria devem ser amostras frescas de tecidos, sangue ou urina, colhidas antes da administração de antibióticos; mas dependendo do grau de contaminação pode-se utilizar o 5-fluorouracil ou outro agente antimicrobiano seletivo para inibir os contaminantes (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Recentemente, a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido usada para o diagnóstico molecular da *Leptospira* e há uma tendência de que esse método diagnóstico seja usado no lugar de testes sorológicos em áreas endêmicas devido a sua sensibilidade, uma vez que não requer a presença de microrganismos viáveis nas amostras, bem como sua capacidade de gerar um resultado rapidamente. A PCR em tempo real é uma técnica mais rápida que a PCR convencional e mostra-se menos sensível a contaminações. Os ensaios da PCR podem se basear na detecção de genes presentes nas bactérias em geral, como por exemplo *gryB*, *rrs* (gene 16S rRNA) e *secY*, bem como na detecção de genes restritos à *Leptospira*, como por exemplo *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA* e *ligB*. Entretanto, o resultado positivo na PCR, embora demonstre a presença do agente, não permite a identificação das sorovariiedades, que podem ser identificadas pela análise da “melting curve” dos produtos amplificados ou pelo sequenciamento, que pode

identificar as espécies e, em alguns casos, os genótipos (THAIPADUNPANIT et al., 2011; PICARDEU, 2013; ELLIS, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADLER, B. History of Leptospirosis and *Leptospira*. In: ADLER, B. ***Leptospira and Leptospirosis***, Springer Berlin Heidelberg, 2015. 295p. p. 1 – 10.

AHMED, A.; GROBUSCH, M. P.; KLATSER, P. R.; HARTSKEERL, R. A. Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 3, n. 2, 12 p., 2012.

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

AZEVEDO, S. S.; SOTO, F. R. M.; MORAIS, Z. M.; PINHEIRO, S. R.; VUADEN, E. R.; BATISTA, C. S. A.; SOUZA, G. O.; DELBEM, A. C. B.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Frequency of anti leptospire agglutinins in sows from a swine herd in the Ibiúna Municipality, State of São Paulo, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.97-100, 2006.

BHARTI, A.; NALLY, J.; RICALDI, J.; MATTHIAS, M.; DIAZ, M.; LOVETT, M.; LEVETT, P.; GILMAN, R.; WILLIG, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa nº 19 de 15 de fevereiro de 2002. Normas para a certificação de granjas de reprodutores suídeos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 32, 15 de fevereiro de 2002. Sessão 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual do Sistema Nacional de Informação Zoossanitária – SIZ.** Ministério da Agricultura – Brasília: MAPA/ACS, 2013. 40p.

BRASIL. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 32, p. 23-24, 17 de fevereiro de 2016. Sessão 1. 2016a.

BRASIL. Casos confirmados de leptospirose. Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 2000 a 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>. Acessado em: 07/09/2016b.

CAMERON, C. E. Leptospiral structure, physiology and metabolism. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Springer Berlin Heidelberg, 2015. 295p. p. 21 – 42.

CARDOSO, G. A. **Perfil epidemiológico dos casos de leptospirose atendidos no Centro de Medicina Tropical de Rondônia no período de 2009 a 2014.** 2015. Tese (Mestrado em Ensino em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho, 2015.

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. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 3 - 11, 2008.

CASTRO, J. R.; SALABERRY, S. R. S.; SOUZA, M. A.; RIBEIRO, A. M. C. L. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 217 – 222, 2011.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical.** São Paulo: Atheneu, 690 p., 2003.

DIVERS, T. J.; PEEK, S. F. **Rebhun's Diseases of Dairy Cattle**. Missouri: Saunders Elsevier. 2008. 686p.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Springer Berlin Heidelberg, 2015. 295p. p. 99 – 138.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1 – 17, 2010.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Australia: Medisci Press, 1999. 272p.

FÁVERO, M., PINHEIRO, S. R., VASCONCELLOS, S. A., MORAIS, Z. M., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose Bovina – Variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2002.

FLÓREZ, P. A.; RETREPO, M.; LOTERO, M. A. Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la Leptospirosis humana. **Biomédica – Revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 26, n. 2, p. 216 – 223. 2006.

FURQUIM, M. E. C; SANTOS, R. F.; MATHIAS, L. A. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em equídeos abatidos em frigorífico exportador do estado de Minas Gerais. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 55, 2015.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Springer Berlin Heidelberg, 2015. 295p. p. 65 – 98.

HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.1, p. 86-94, 2014.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). **Journal of Experimental Medicine**, v. 23, n. 3, p. 377–402, 1916.

LAGE, A. P.; LEITE, R. M. H.; THOMPSON, J. A.; BANDEIRA, D. A., HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; GONÇALVES, V. S. P. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 185-190, 2007.

LANGONI, H.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; CABRAL, K. G.; SOLVA, A.V. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 37-41, 2000.

LANGONI, H.; PONTE, M. C.; BARBOSA, D.; MANZI, M. P.; SILVA, R. C.; MENOZZI, B. D. Pesquisa de anticorpos e de DNA de *Leptospira* spp. em soro canino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 3, p. 429-436, 2015.

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

LEVETT, P. N. Systematics of *Leptospiraceae*. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Springer Berlin Heidelberg, 2015. 295p. p. 11 – 20.

NÁJERA, S.; ALVIS, N.; BABILONIA, D.; ALVARZ, L.; MÁTTAR, S. Occupational leptospirosis in a Colombian Caribbean area. **Salud Pública de México**, México, v. 47, n. 3, p. 240-244, 2005.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**, 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2003. p. 137.

NICOLINO, R. R.; LOPES, L. B.; RODRIGUES, R. O.; TEIXEIRA, J. F. B.; HADDAD, J. P. A. Prevalence and spacial analysis of antileptospiral agglutinins in dairy cattle – Microrregion of Sete Lagoas, Minas Gerais, 2009/2010. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 648 - 654, 2014.

OCHOA, J. E.; SÁNCHEZ, A.; RUIZ, I. Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuária. **Revista de la Asociación Colombiana de Infectología**, Medellín, v.5, n. 2, p. 96 -105, 2001.

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. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas de idade reprodutiva no estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 539 - 546, 2009.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, França, n. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

PIRES NETO, J. A. S.; HESSE, F.; OLIVEIRA, M. A. M. Leptospirose equina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. **Veterinária em Foco**, v.2, n. 2, p. 165-176, 2005.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

ROHRBACH, B.; WARD, D.; HENDRIX, D.; CAWRSE-FOSS, M.; MOYERS, T. Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 3, p. 171-179, 2005.

SALOMÃO, R.; PIGNATARI, A.C.C. **Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da Infectologia**. Barueri, SP: Manole, 2004. 580 p.

SANTA ROSA, C. A. et al. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 29/30, p. 19-27, 1969/1970.

SANTOS, R. F. **Anticorpos contra *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em equídeos da região Sul do Brasil abatidos em matadouro-frigorífico**. 2014. 59f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus Jaboticabal, São Paulo. 2014.

SEGURA, E.R.; GANOSA, C.A.; CAMPOS, K.; RICARDI, J.N.; TORRES, S.; SILVA, H.; CESPEDES, M.J.; MATTHIAS, M.A.; SWANCUTT, M.A.; LOPES, L.R.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; GILMARA, R.H.; VINETZ, J.M. Peru-United States Leptospirosis Consortium. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.40, p.343-35, 2005.

SILVA, F. J.; CONCEIÇÃO, W. L. F.; FAGLIARI, J. J.; GÍRIO, R. J. S.; DIAS, R. A.; BORBA, M. R.; MATHIAS, L. A. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 303-312, 2012.

SILVA, G. C. P. **Caracterização epidemiológica de brucelose e leptospirose de pequenos ruminantes dos estados de Sergipe, Bahia, Ceará e Paraíba**. 2015. 112. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus Jaboticabal, São Paulo. 2015.

STIMSON, A. M. Note on an organism found in yellow-fever tissue. **Public Health Reports**, v. 22, n. 18, p. 541, 1907.

THAIPADUNPANIT, J.; CHIERAKUL, W.; WUTHIEKANUN, V, LIMMATHUROTSAKUL, D.; AMORNCHAI, P.; BOONSLIP, S.; SMYTHE, L. D.; LIMPAIBOON, R.; HOFFMASTER, A. R.; DAY, N. P.; PEACOCK, S. J. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and LipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1; p. 1 – 6, 2011.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades Infecciosas**. In: THOMASSIAN, A, **Enfermidades dos Cavalos**. São Paulo, Livrarias Varela, 4. ed., 2005.

YAN, W.; FAISAL, S.M.; DIVERS, T.; McDONOUGH, S.P.; AKEY, B.; CHANG, Y.F.
Experimental *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki infection of horses. **Journal of
Veterinary Internal Medicine**, v.24, n. 4, p. 912-7, 2010.

CAPÍTULO DOIS - Anticorpos contra *Leptospira* spp. em amostras de soro sanguíneo bovino analisadas no período de 2007 a 2015 provenientes de diversos estados brasileiros

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp., foram analisadas 24.483 amostras de soro sanguíneo bovino, provenientes de 21 estados brasileiros, recebidas no período de 2007 a 2015. Destas, 8.643 (35,3%) foram reagentes no teste de soroaglutinação microscópica a uma ou mais sorovariedades de *Leptospira* spp., e as sorovariedades com maior frequência foram Wolffii (61,47%), Tarassovi (9,62%) e Pomona (7,20%). A sorovariedade Hardjo apresentou prevalência de 6,27%. Entre os 21 estados analisados, o Estado de Pernambuco apresentou a maior frequência, com 88,24%, e o Estado de São Paulo foi a origem do maior número de amostras para análise, 13.838, com frequência de 31,54% de reagentes.

Palavras-chave: Leptospirose, Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT), Epidemiologia.

CHAPTER TWO - Antibodies to *Leptospira* spp. in bovine serum samples analyzed from 2007 to 2015 from several Brazilian states

ABSTRACT

In order to know the frequency of anti-*Leptospira* spp. antibodies, 24,483 bovine serum samples received from 21 Brazilian states between 2007 and 2015 were analyzed. Of these, 8,643 (35.3%) were positive in the microscopic agglutination test for one or more serovars of *Leptospira* spp, and the most commonly reacting serovars were Wolffi (61.47%), Tarassovi (9.62%), and Pomona (7.20%). Serovar Hardjo had a prevalence of 6.27%. The state of Pernambuco had the highest frequency among the states analyzed, with 88.24%, and the State of São Paulo were the origin of the largest number of samples for analysis, 13,838, with a frequency of 31.54% of reacting sera.

Keyword: Leptospirosis, Microscopic Agglutination Test (MAT), Epidemiology.

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose relatada em todas as espécies animais já estudadas e encontrada em todos os continentes, com exceção da Antártica. É causada por bactérias espiroquetas da família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010).

Sorologicamente podem-se distinguir mais de 260 sorovariedades de *Leptospira* agrupadas de acordo com sua antigenicidade (ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010). Tais sorovariedades possuem predileção por seu hospedeiro animal (hospedeiro de manutenção), entretanto podem infectar outras espécies animais (hospedeiros acidentais) (LEVETT, 2001).

É uma doença de caráter sazonal e que ocorre com maior frequência em áreas tropicais que propiciam as condições para a sua transmissão, uma vez que estes microrganismos sobrevivem em ambientes quentes e úmidos. A maior incidência da leptospirose ocorre no verão ou no outono em regiões de clima temperado, ou durante estações chuvosas em regiões de clima quente (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2004).

A leptospirose bovina provoca sinais clínicos variados, como febre, diarreia, anemia, icterícia e hemoglobinúria. Em casos de infecções agudas, os animais apresentam infertilidade, abortamentos, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos e mastite (ELLIS, 1994). Em rebanhos leiteiros, é responsável pelo decréscimo da produção de leite, levando a grandes perdas econômicas neste setor (BENNETT, 2003).

O programa de controle da leptospirose a ser implantado irá depender do objetivo do mesmo, seja para o controle da doença clínica, a criação de uma população imune, ou pela erradicação da doença de um rebanho, tornando-o susceptível. As ferramentas utilizadas para o controle são: vacinação; tratamento com antibióticos, remoção dos animais infectados, controle de roedores, redução dos fatores de risco pelo manejo, entre outros (ELIS, 2015).

Os bovinos são hospedeiros de manutenção da sorovariedade Hardjo, que possui dois tipos que são indistinguíveis sorologicamente, mas podem ser identificados geneticamente: *Leptospira interrogans* sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno; *Leptospira borgpetersenii* sorovariedade Hardjo, tipo Hardjo-bovis (BOLIN, 2003).

No Brasil, a presença de aglutininas anti-*Leptospira* já foi reportada em todos os estados, sempre com altas taxas de prevalência, tanto em nível individual como em rebanhos (NICOLINO et al., 2014). Notam-se sorovariedades como Wolffi,

Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Pomona e Grippytyphosa presentes nos rebanhos bovinos, porém a sorovariedade Hardjo é a mais observada (FÁVERO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2005; JULIANO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009; CASTRO et al., 2008).

Deve-se levar também em consideração que as sorovariedades prevalentes podem mudar com o passar do tempo, devido a fatores intrínsecos e/ou extrínsecos capazes de alterar o equilíbrio da tríade epidemiológica, composta por ambiente, hospedeiro e agente. Com isso, considerando a importância do conhecimento das sorovariedades presentes na população bovina do Brasil, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em exames de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose bovina realizados na rotina do Laboratório de Brucelose e Leptospirose entre os anos de 2007 e 2015, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV - Unesp, Câmpus Jaboticabal – SP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste trabalho realizou-se o levantamento dos resultados do teste de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose bovina efetuados durante a rotina do Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose (LabLepBru), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV - Unesp, Câmpus Jaboticabal-SP, compreendendo os anos de 2007 a 2015.

As informações analisadas foram tabuladas a partir dos registros salvos no banco de dados do LabLepBru, sendo considerados os parâmetros: data de entrada das amostras, data da realização dos exames, município de origem, espécie animal, sexo e os resultados da MAT (título e interpretação).

Os antígenos de *Leptospira* spp. utilizados nos testes sorológicos foram repicados semanalmente em meio de cultura líquido EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris), tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear, e mantidos em estufa bacteriológica BOD a 29°C ±1°C (OIE, 2014).

As sorovariedades de *Leptospira* spp. utilizadas no teste de soroaglutinação microscópica foram: Australis, Autumnalis, Bratislava, Canicola, Copenhageni,

Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi e Wolffi.

As amostras de soro sanguíneo foram diluídas em solução salina, sendo a diluição inicial 1/50. Alíquotas de 25 µL foram colocadas em placas de poliestireno, com fundo chato, e adicionada igual quantidade de antígeno, de 14 sorovariedades de *Leptospira* spp., resultando na diluição 1/100. A mistura de soro-antígeno foi levemente homogeneizada e incubada em estufa BOD à temperatura de 28°C por 40 a 120 minutos, procedendo-se a seguir à leitura em microscopia de campo escuro (microscópio Zeiss – Axio Imaginer A1), com objetiva e ocular de 10x, diretamente nos poços da placa (OIE, 2014).

Foram consideradas reagentes as amostras em que ocorreu 50% de aglutinação, estando metade das leptospiros aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. As amostras reagentes na diluição inicial foram testadas com diluições seriadas de razão dois, sendo a primeira diluição 1/100, conforme a recomendação da OIE (2014).

Para a análise estatística dos dados, foram desconsiderados os resultados das amostras com títulos iguais contra uma ou mais sorovariedades na MAT. Os resultados das frequências encontradas entre as variáveis estudadas (sexo) foram analisados por meio do teste do qui-quadrado ou do teste exato de Fisher, usando o software R (R CORE TEAM, 2003). O intervalo de confiança (IC) das frequências de reagentes observadas foi calculado utilizando a metodologia preconizada por Thrusfield (2005). Para a confecção dos mapas temáticos foi utilizado o software TerraView (TERRAVIEW, 2010).

3. RESULTADOS

Foram examinadas 24.483 amostras (Figura 1) de soro bovino. Destas, 8.643 foram reagentes, no teste de soroaglutinação microscópica (MAT), contra uma ou mais sorovariedades de *Leptospira* spp. (35,30%; IC 95% = 34,70 - 35,90).

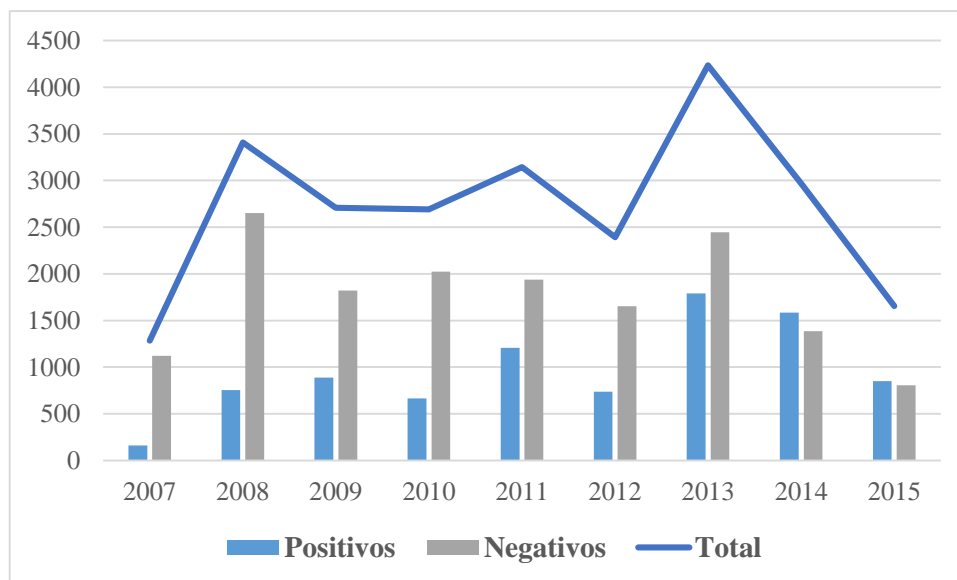


Figura 1. Distribuição das amostras de soro bovino em relação ao ano de realização da MAT e à interpretação dos resultados do diagnóstico de leptospirose, entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

No ano de 2007, foram analisadas 1.283 amostras de soro bovino e, destas, 161 foram reagentes (12,5%; IC 95% = 10,74% - 14,36%) a uma ou mais sorovariedades de *Leptospira* spp. Em 2008, foram analisadas 3.407 amostras, sendo 756 reagentes (22,19%; IC 95% = 20,79% - 25,58%). Em 2009, foram examinadas 2.709 amostras, sendo 889 reagentes (32,82%; IC 95% = 31,05% - 34,58%). No ano de 2010, foram analisadas 2.690 amostras e, destas, 667 foram reagentes (24,80%; IC 95% = 23,16% - 26,43%). Em 2011, das 3.145 amostras examinadas, 1.206 foram reagentes (38,34%; IC 95% = 36,65% - 40,05%). Já no ano de 2012, 2.391 amostras de soro bovino foram examinadas, sendo 739 (30,91%; IC 95% = 29,06% - 32,76%) reagentes a uma ou mais sorovariedades do agente. Em 2013, 4.235 foram analisadas, sendo 1.791 reagentes (42,29%; IC 95% = 40,80% - 43,78%). Em 2014, foram examinadas 2.969 amostras, sendo 1.585 reagentes (53,84%; IC 95% = 51,59% - 55,18%). Em 2015, foram analisadas

1.654 amostras de soro bovino, sendo 849 reagentes (51,33%; IC 95% = 48,92% – 53,74%). Tais dados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de amostras de soro bovino reagentes contra *Leptospira* spp. em relação ao ano em que foram analisadas, no período de 2007 a 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Ano	Animais		Frequência (%)	IC 95% (%)
	Analisados	Reagentes		
2007	1.283	161	12,55	10,74 - 14,36
2008	3.407	756	22,19	20,79 - 25,58
2009	2.709	889	32,82	31,05 - 34,58
2010	2.690	667	24,80	23,16 - 26,43
2011	3.145	1.206	38,34	36,65 - 40,05
2012	2.391	739	30,91	29,06 - 32,76
2013	4.235	1.791	42,29	40,80 - 43,78
2014	2.969	1.585	53,84	51,59 - 55,18
2015	1.654	849	51,33	48,92 - 53,74
Total	24.483	8.643	35,30	34,70 - 35,90

IC: Intervalo de Confiança

Das 8.643 amostras sororreagentes no MAT, 6.829 (79%) foram positivas apenas contra uma sorovariedade de *Leptospira* spp., enquanto 1.814 (21%) possuíam títulos iguais entre duas ou mais sorovarietades de *Leptospira* spp. Para a análise estatística dos dados, foram desconsiderados os resultados das amostras com títulos iguais contra duas ou mais sorovarietades (21%), uma vez que tais títulos não possibilitam identificar a sorovariedade infectante mais provável.

Os títulos das amostras variaram entre 100 e 1.600 para as 14 sorovarietades utilizadas no teste de diagnóstico sorológico. O título 200 foi o mais frequente, observado em 2.610 (38,2%) das amostras reagentes. Em seguida, o título 100, com 2.254 (33%) das amostras reagentes; o título 800, com 1.134 (16,6%); o título 400, contendo 829 (12,1%); e por fim o título 1.600, com 2 (0,03%) dos animais reagentes (Figura 2 e Tabela 2).

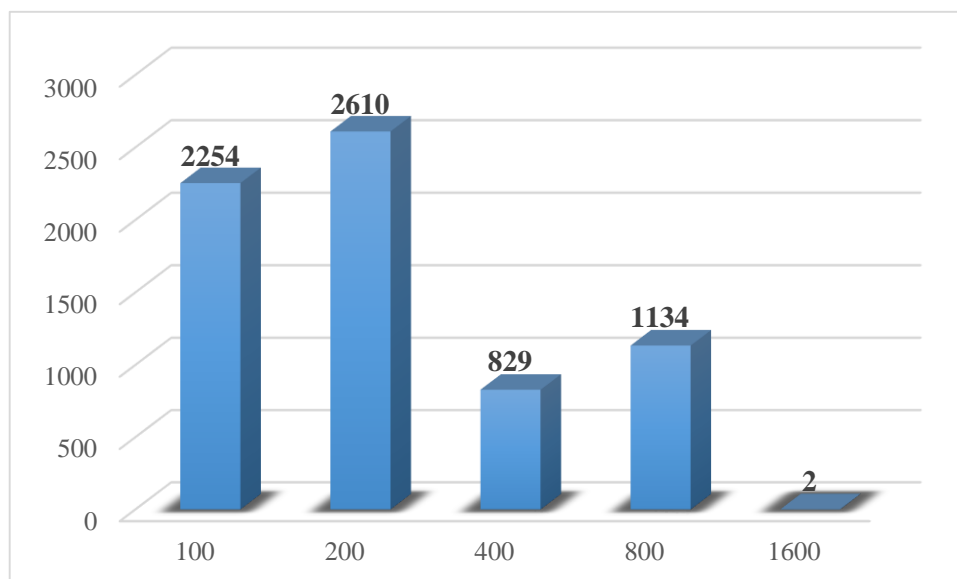


Figura 2. Distribuição das amostras reagentes no teste de soroadglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose bovina em relação aos títulos encontrados durante a análise entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

A sorovariedade de maior ocorrência foi Wolffii, com 4.198 animais reagentes, dentre os 6.829 animais reagentes no teste de soroadglutinação microscópica, seguida da sorovariedade Tarassovi, com 657 (9,62%), Pomona, com 492 (7,20%), Grippotyphosa, com 489 (7,16%), Hardjo, com 428 (6,27%), Icterohaemorrhagiae, com 346 (5,07%), Copenhageni, com 133 (1,95%), Canicola, com 69 (1,01%), Hebdomadis, com 9 (0,13%), Autumnalis, com 3 (0,04%), Patoc, com 2 (0,03%), Australis, com 1 (0,01%), Bratislava, com 1 (0,01%), e Pyrogenes, com 1 (0,01%) (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Número de reações conforme o título de aglutininas contra as sorovariedades utilizadas no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose bovina, nas 8.643 amostras sororreagentes, entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Sorovariedades	Título					Total	
	100	200	400	800	1600	N	%
Australis	1					1	0,01
Autumnalis	1	1	1			3	0,04
Bratislava	1					1	0,01
Canicola	23	25	12	9		69	1,01
Copenhageni	52	44	13	24		133	1,95
Grippotyphosa	139	215	50	85		489	7,16
Hardjo	199	152	38	38	1	428	6,27
Hebdomadis	7	1		1		9	0,13
Icterohaemorrhagiae	154	134	46	12		346	5,07
Patoc	1		1			2	0,03
Pomona	129	180	75	108		492	7,20
Pyrogenes	1					1	0,01
Tarassovi	234	282	78	63		657	9,62
Wolffi	1.312	1.576	515	794	1	4.198	61,47
Total	2.254 (33%)	2.610 (38,2%)	829 (12,1%)	1.134 (16,6%)	2 (0,03%)	6.829	100,00

N: número de animais reagentes em cada título de aglutininas

%; porcentagem de animais reagentes em cada título de aglutininas em relação ao total de animais positivos

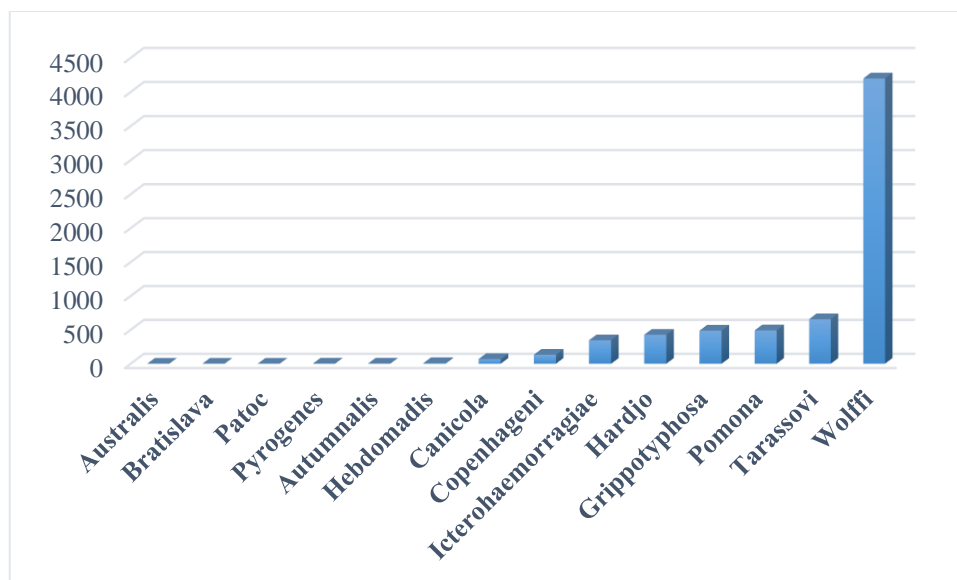


Figura 3. Distribuição das sorovariedades nas amostras reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose bovina em relação aos títulos encontrados durante a análise entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Somente 15.017 (61,34%) das amostras possuíam em suas fichas a informação em relação ao sexo dos animais. Destes, 10.692 (71,20%) eram de fêmeas e 4.325 (28,80%) eram de machos. A frequência encontrada em animais do sexo feminino foi 37,53% e para o sexo masculino 28,39% (Tabela 3), tendo sido observada diferença significativa entre essas proporções ($P < 0,001$).

Tabela 3. Frequência de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, em relação ao sexo, nas amostras analisadas entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

	Analizados	Reagentes	Frequência (%)	IC 95% (%)	X ²	Valor P
Fêmea	10.692	4.013	37,53	36,61 - 38,45	112,8157	<2,2 e-16
Macho	4.325	1.228	28,39	27,05 - 29,74		

IC = intervalo de confiança

Dentre o total de amostras, 680 destas não apresentavam informação sobre o local de origem em suas fichas e 40% apresentaram anticorpos contra *Leptospira*. O restante das amostras provinha de 21 estados brasileiros, com exceção dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Paraíba, Piauí e Rio Grande do Norte (Figura 4). As frequências de reagentes por estado variaram entre 88,24% (IC 95%: 73,38% - 95,33%) e 6,67% (IC

95%: 1,19% - 29,82%). O estado com maior frequência de amostras reagentes foi Pernambuco (PE), com 88,24% (IC 95%: 73,38% - 95,33%). Já o Estado de São Paulo (Figura 5, Anexo 1) foi o que apresentou o maior número de amostras enviadas para análise (13.838 amostras), com frequência de reagentes de 31,54% (IC 95%: 30,76% - 32,31%). Em seguida está o Estado de Minas Gerais, com 3.758 amostras enviadas e frequência de reagentes de 33,69% (IC 95%: 32,18 – 35,20) (Figura 6, Anexo 2). O restante dos dados relacionados ao estado de origem das amostras enviadas está representado na Tabela 4.

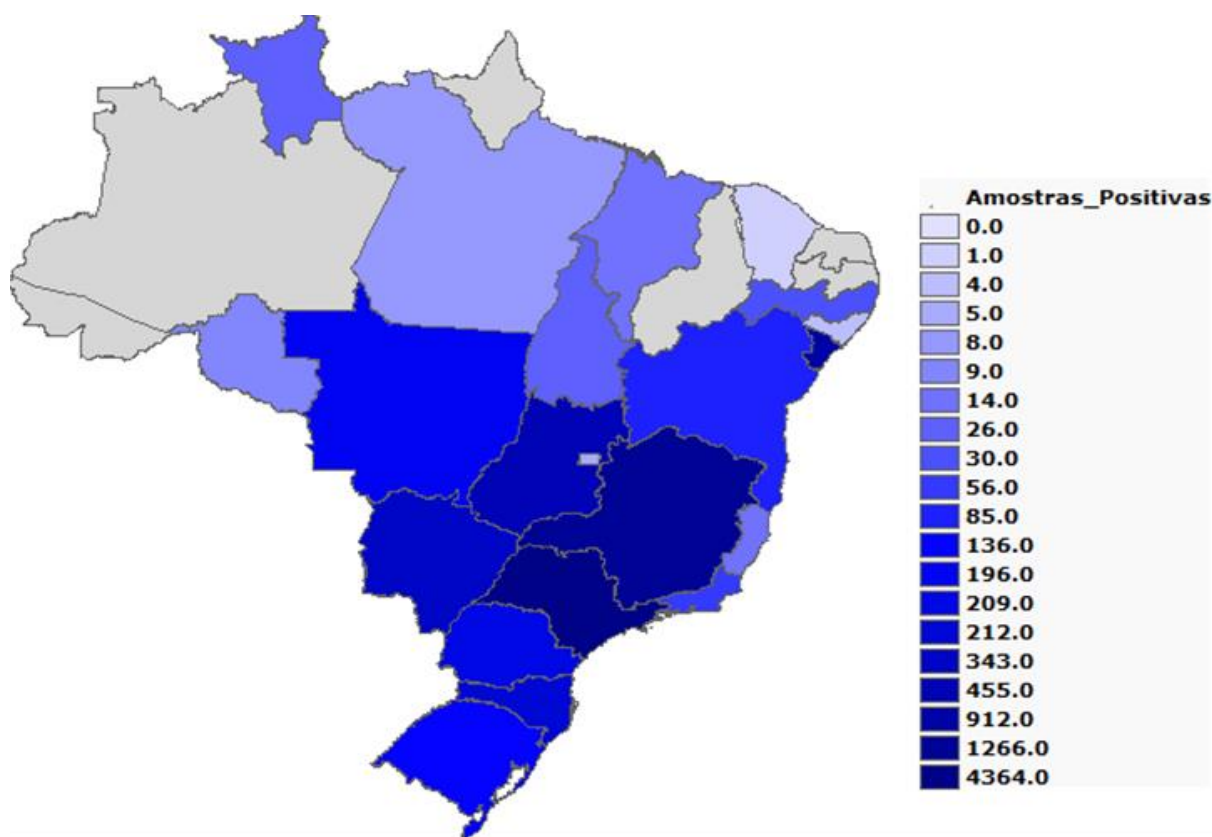


Figura 4. Mapa do Brasil mostrando a distribuição das amostras reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose bovina encontradas durante a análise entre os anos de 2007 e 2015 Jaboticabal, SP, 2016. Os estados marcados em cinza não enviaram nenhuma amostra para análise.

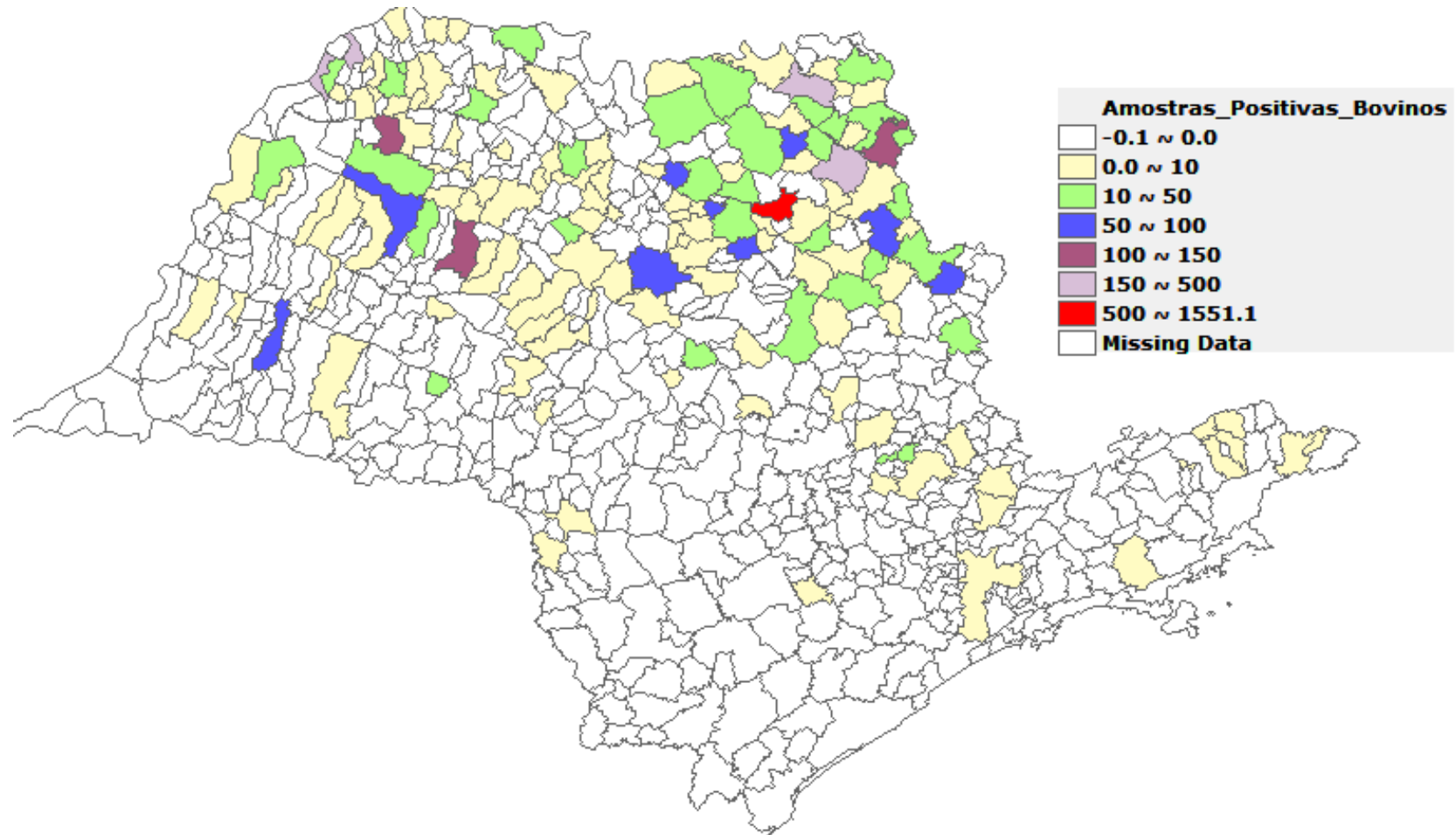


Figura 5. Mapa do Estado de São Paulo mostrando a distribuição das amostras reagentes no teste de soroglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose bovina em relação aos municípios encontrados durante a análise entre os anos de 2007 e 2015 Jaboticabal, SP, 2016

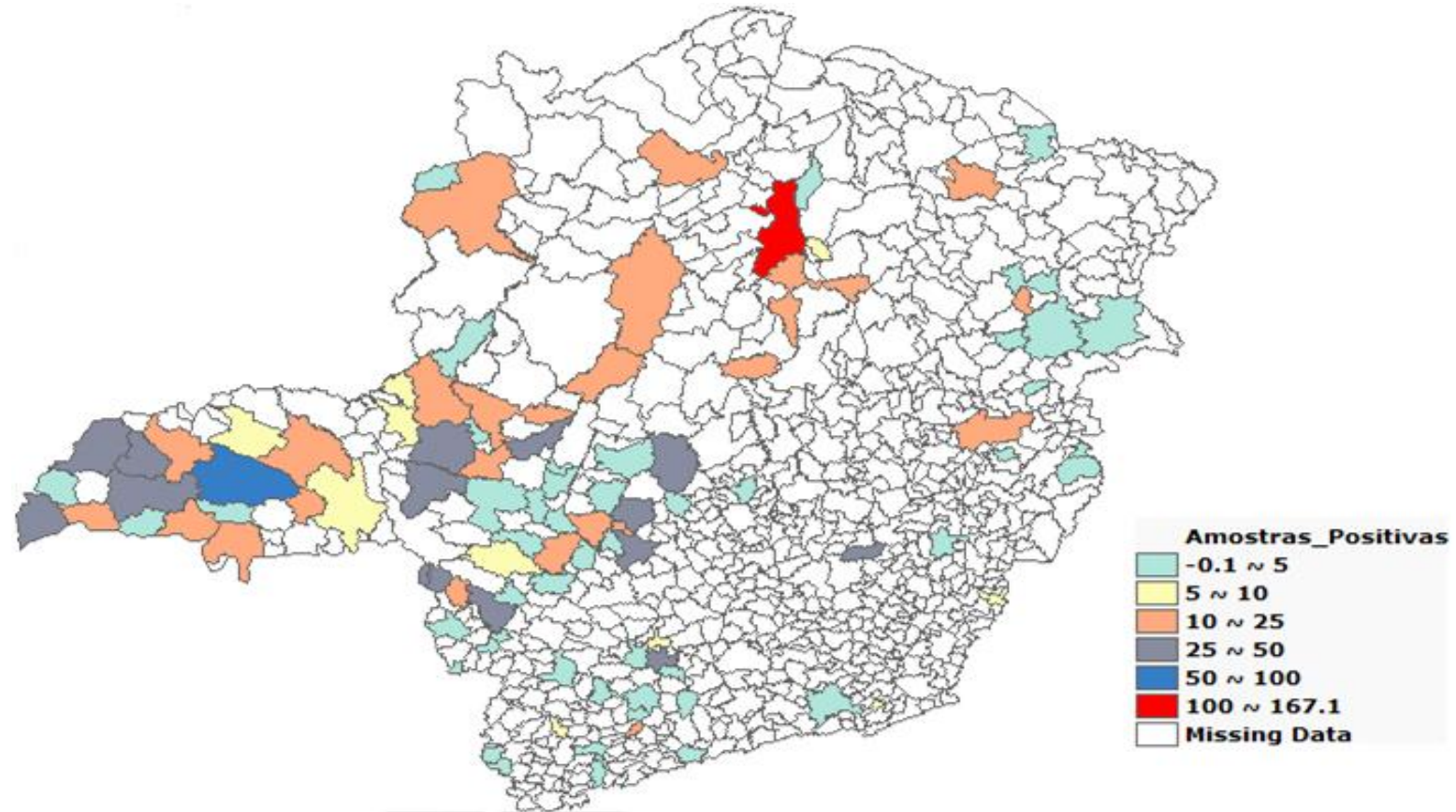


Figura 5. Mapa do Estado de Minas Gerais mostrando a distribuição das amostras reagentes no teste de soroprecipitação microscópica para diagnóstico de leptospirose bovina em relação aos municípios encontrados durante a análise entre os anos de 2007 e 2015 Jaboticabal, SP, 2016.

Tabela 4. Frequência de bovinos reagentes no teste de soraglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose em relação ao estado de origem das amostras enviadas para análise entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Estados	Animais		Frequência (%)	IC 95% (%)
	Analizados	Reagentes		
AL	9	4	44,44	11,98 - 76,91
BA	294	85	28,91	23,73 - 34,09
CE	15	1	6,67	1,19 - 29,82
DF	20	5	25,00	11,19 - 46,87
ES	52	14	26,92	14,87 - 38,98
GO	998	455	45,59	42,50 - 48,68
MA	34	14	41,18	24,63 - 57,72
MG	3.758	1.266	33,69	32,18 - 35,20
MS	541	343	63,40	59,34 - 67,46
MT	340	196	57,65	52,39 - 62,90
PA	14	8	57,14	31,22 - 83,07
PE	34	30	88,24	73,38 - 95,33
PR	629	209	33,23	29,55 - 36,91
RJ	250	56	22,40	17,23 - 27,57
RO	13	9	69,23	42,37 - 87,32
RR	42	26	61,90	47,22 - 76,59
RS	311	136	43,73	38,22 - 49,24
SC	857	212	24,75	21,85 - 27,63
SE	1.712	912	53,27	50,91 - 55,63
SP	13.838	4.364	31,54	30,76 - 32,31
TO	42	26	61,90	47,22 - 76,59
Total	23.803	8.371	35,30	34,70 - 35,90

IC: Intervalo de Confiança

4. DISCUSSÃO

O estudo retrospectivo dos dados laboratoriais para a detecção de aglutininas anti-*Leptospira* spp. permitiu verificar a distribuição deste agente pelo território nacional, uma vez que entre os anos de 2007 e 2015 as amostras analisadas provinham de 21 estados brasileiros. Não foram recebidas amostras dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Paraíba, Piauí e Rio Grande do Norte.

A frequência encontrada de amostras reagentes foi 35,30% (8.643) no período analisado. Em estudo similar abrangendo o período entre 1984 e 1997, obteve-se uma frequência de 37,94% (11.884) na análise de 31.325 registros de exames de leptospirose bovina em amostras de 21 estados brasileiros (FÁVERO et al., 2001).

Usualmente, na espécie bovina, o diagnóstico diferencial de leptospirose é decorrente de uma suspeita clínica na presença de transtornos reprodutivos ou como parte da rotina de centrais de inseminação como forma de evitar tais transtornos. Identifica-se que a sorovariedade Harjdo seja a de maior ocorrência nessa espécie, uma vez que ela atua como seu hospedeiro de manutenção e, nesses animais, tal sorovariedade é responsável por grande impacto econômico devido aos abortamentos e à queda na produção de leite. Entretanto, neste estudo, a sorovariedade Wolffi apresentou a maior frequência (61,47%) entre as sorovarietades empregadas na MAT. Da mesma forma, em trabalho realizado por Langoni et al. (2000) em 2.761 amostras de soro bovino provenientes de diferentes regiões do estado de SP, a sorovariedade Wolffi foi a mais frequente, com 70,59%.

Em relação à sorovariedade Hardjo, esta apresentou frequência de 6,27% entre as amostras analisadas. Já em trabalhos realizados por Araújo et al. (2005), Lage et al. (2007), Oliveira et al. (2009) e Nicolino et al. (2014), as frequências obtidas variaram de 14,95% a 23,7%.

A maior frequência da sorovariedade Wolffi em relação à sorovariedade Hardjo pode ser explicada por fatores ecológicos resultantes da relação das diversas sorovarietades de *Leptospira* e os animais em relação ao ambiente em que habitam (FAINE, 1982). Desta forma, é possível inferir que, com o passar do tempo, algumas sorovarietades podem se tornar mais prevalentes em relação a outras na presença de um desequilíbrio da tríade epidemiológica.

As sorovarietades Hardjo e Wolffi pertencem ao sorogrupo Sejroe e, desta forma, são antigenicamente semelhantes, o que possibilita a ocorrência de reações cruzadas

durante o diagnóstico sorológico, aumentando a presença de resultados falso-positivos. Tal fato é comprovado por pesquisa realizada por Tabata et al. (2002b), que, ao testar vacinas com bacterinas específicas para cada sorovariedade do sorogrupo Sejroe (Hardjo, Wolffi e Guaricura), obtiveram resultados positivos para as três sorovarietades ao realizar a MAT nos animais estudados. No entanto, não existem relatos a respeito do isolamento da sorovariedade Wolffi no Brasil, ao contrário da sorovariedade Hardjo, que foi isolada pela primeira vez por Moreira (1994). Com isso, é possível que a alta frequência de animais reagentes à sorovariedade Wolffi no presente trabalho seja decorrente de reação cruzada entre as variantes sorológicas.

A frequência de reagentes contra as sorovarietades Tarassovi e Pomona foi de 9,62% e 7,20%, respectivamente. Em outras investigações, as frequências de Tarassovi e Pomona variaram de 0,329% a 3,3% e 0,54% a 2,8%, respectivamente (ARAÚJO et al. 2005; CASTRO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; SILVA, 2011).

Essas sorovarietades são conhecidas por terem a espécie suína como seu hospedeiro de manutenção (LEVETT, 2001). Atualmente, existe uma tendência de especialização da bovinocultura e da suinocultura, em que as espécies suína e bovina não são criadas em uma mesma propriedade, contribuindo, assim, com a diminuição da contaminação ambiental por essas sorovarietades de *Leptospira*. No entanto, ainda é grande o número de propriedades rurais que não possuem nenhum tipo de tecnificação e criam diferentes espécies animais em um mesmo espaço.

Em estudo realizado em Pernambuco no ano de 2005, a frequência de animais reagentes para leptospirose encontrada em um rebanho bovino foi de 57,7% (TENÓRIO et al., 2005). Já neste trabalho, a frequência encontrada para o estado foi de 88,24%, sendo o maior valor em relação aos demais estados estudados.

O Estado de São Paulo apresentou frequência de 31,54%, e em outros estudos realizados no estado, as frequências encontradas variaram de 35% a 49,4% (FÁVERO et al., 2001; CASTRO et al., 2008). Já em relação ao Estado de Minas Gerais, a frequência encontrada para a espécie bovina em estudos diversos está entre 21,7% e 65,20% (FÁVERO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2005; NICOLINO et al., 2014). No presente estudo, a frequência observada foi de 33,69%, valor situado entre aqueles extremos mencionados acima.

Os títulos 100 ou 200 indicam a existência de infecção recente ou anterior ao teste, bem como a presença de anticorpos vacinais (PICARDEAU, 2013). Já títulos superiores

a 400 são considerados como indicativos de infecção atual, na presença de sintomatologia clínica e correto histórico animal (FAINE et al., 1999).

Atualmente, as vacinas comerciais disponíveis contra leptospirose bovina normalmente contêm as sorovariedades Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola e Grippotyphosa. Também podem ser encontradas vacinas que, além dessas sorovariedades, contêm outras, como Wolffi e Copenhageni.

Os títulos entre 100 e 200 encontrados neste trabalho corresponderam a 71,20% dos títulos obtidos em amostras reagentes, entretanto as fichas correspondentes às amostras não continham as informações vacinais dos animais, impossibilitando inferir que tais títulos sejam decorrentes da vacinação.

Ao realizar a vacinação de um rebanho, deve-se levar em consideração o tempo entre as aplicações, as sorovariedades presentes na vacina e o tipo de vacina, pois tais fatores podem interferir na produção de anticorpos (ARDUINO et al., 2009). Também deve-se considerar a produção de imunidade heteróloga, entretanto a expressão dos antígenos envolvidos pode ser ausente ou fraca (ADLER, 2015).

Em estudo realizado por Tabata (2002a), pesquisou-se a proteção cruzada entre vacinas formuladas a partir de antígenos do sorogupo Sejroe e verificou-se que a vacina produzida com a sorovariedade Hardjo induziu resposta imunológica contra a sorovariedade Wolffi, porém não foi capaz de induzir proteção contra a sua variante sorológica homóloga Hardjo, enquanto a vacina produzida a partir da sorovariedade Wolffi induziu imunidade tanto contra sua variante sorológica homóloga Wolffi como contra a sorovariedade Hardjo. Já em trabalho realizado por Arduino et al. (2009), tanto a sorovariedade Wolffi quanto a Hardjo foram capazes de produzir imunidade cruzada entre si.

A observação dos títulos de 400, 800 e 1.600 encontrados, correspondentes a 28,8% dos títulos, permite questionar se esses animais estão realmente sendo vacinados, uma vez que a vacinação contra a leptospirose bovina fica a critério do proprietário. Caso a vacinação tenha ocorrido nesses animais, ou ao menos em parte deles, é preciso verificar a eficácia das vacinas utilizadas, já que o total de animais encontrados com esses títulos é expressivo, e a imunidade cruzada entre as sorovariedades pode nem sempre ocorrer.

5. CONCLUSÃO

A leptospirose bovina é uma doença amplamente disseminada no território brasileiro, e a sorovariedade Wolffi foi a mais frequente, com 61,47% entre as amostras reagentes dos estados brasileiros estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADLER, B. Vaccines against Leptospirosis. In: ADLER, B. ***Leptospira and Leptospirosis***, Springer Berlin Heidelberg, 2015. 295p. p. 251 – 272.

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

ARDUINO, G. G. C.; GIRIO, R. J. S.; MAGAJEVSKI, F. S.; PEREIRA, G. T. Título de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 575 – 582, 2009.

BENNET, R. M. The ‘direct costs’ of livestock disease: The development of a system of models for the analysis of 30 endemic livestock diseases in Great Britain. **Journal of Agricultural Economics**, v. 54, p. 55-71, 2003.

BHARTI, A.; NALLY, J.; RICARDI, J.; MATTHIAS, M.; DIAZ, M.; LOVETT, M.; LEVETT, P.; GILMAN, R.; WILLIG, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.

BOLIN, C. A. **Diagnosis and control of bovine leptospirosis**. 2003. Disponível em: http://www.wdmc.org/2003/Diagnosis%20and%20Control%20of%20Bovine%20Leptospirosis.pdf?TB_iframe=true. Acessado em: 14 de julho de 2016.

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. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 3 - 11, 2008.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, p. 463 – 478, 1994.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. 1982. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/37219>>. Acessado em: 12 de julho de 2016.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Australia: Medisci Press, 1999. 272p.

FÁVERO, M., PINHEIRO, S. R., VASCONCELLOS, S. A., MORAIS, Z. M., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina – Variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.

JULIANO, R. S.; CHAVES, N. S. T.; SANTOS, C. A.; RAMOS, L. S.; SANTO, H. Q.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; CORRÊA, R. A. C. F. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 857 – 862, 2000.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 44, n. 2, p. 296 – 326, 2001.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 6, p. 435 – 448, 2004.

LANGONI, H.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; CABRAL, K. G.; SOLVA, A.V. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 37-41, 2000.

MOREIRA, E C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros**. 1994. 93f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

NICOLINO, R. R.; LOPES, L. B.; RODRIGUES, R. O.; TEIXEIRA, J. F. B.; HADDAD, J. P. A. Prevalence and spacial analysis of antileptospiral agglutinins in dairy cattle – Microrregion of Sete Lagoas, Minas Gerais, 2009/2010. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 648 - 654, 2014.

OIE – World Organization for Animal Health. **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals**. 2014. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf>. Acesso em: 26 de novembro de 2015.

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. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas de idade reprodutiva no estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 539 - 546, 2009.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, França, n. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

R CORE TEAM (2003). **R: A language and enviroment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://R-project.org/>>.

SILVA, F. J. **Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado de Maranhão**. 2011. 68f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus Jaboticabal, São Paulo. 2011.

TABATA, R. **Proteção cruzada entre bacterinas antileptospirose produzidas com três representantes do sorogrupo Sejroe. Ensaio experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*)**. 2002. 71f. Tese (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002a.

TABATA, R.; NETO, H. S.; ZUANAZE, M. A. F.; OLIVEIRA, E. M. D.; DIAS, R. A.; MORAIS, Z. M.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup Sejroe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 265 – 268, 2002b.

TENÓRIO, T. G. S.; MELO, L. E. H.; VASCONCELLOS, S. A.; CASTRO, R. S.; SILVA, F. F.; LEITE, J. E. B.; RÊGO, E. W.; VAZ, B. B. U.; BORBA, M. A. C.; MELO, M. T.; CASTRO, V. B.; CAMPOS, K. M. T.; BERTO, R. S.; MENDES, E. I. Soroprevalência da brucelose e leptospirose em rebanhos de bovinos leiteiros do Estado de Pernambuco. **Veterinária Notícias**, v. 11, n. 2, p. 43-48, 2005.

TERRAVIEW 4.1.0. São José dos Campos, SP: INPE, 2010. Disponível em: www.dpi.inpe.br/terraview. Acesso em: 1 de outubro de 2016.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. 3 ed. Oxford: Balckwell Science, 2005. 610p.

CAPÍTULO TRÊS - Anticorpos contra *Leptospira* spp. em amostras de soro canino, equino e outras espécies analisadas no período de 2007 a 2015 provenientes de diversos estados brasileiros

RESUMO

Foram analisadas 3.559 amostras das espécies canina, equina, caprina, ovina, suína, pelo teste de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, e a frequência de reagentes foi de 31,35%. Na espécie canina, 23,93% das amostras foram reagentes, sendo a sorovariedade Canicola a mais frequente (35,37%). Das amostras com informação a respeito da origem, 99,8% eram provenientes do Estado de São Paulo. Das amostras da espécie equina, 46,95% foram reagentes no MAT, e a sorovariedade Icterohaemorrhagiae foi a mais frequente (82,9%). Das amostras com registro do local de origem, 100% das provenientes do Distrito Federal foram reagentes. Do Estado de São Paulo foram recebidas 1.651 amostras, com frequência 46,85%. Já das espécies ovina, caprina e suína, a frequência foi de 7,33%, 1,30% e 6,03%, respectivamente, e a sorovariedade mais frequente foi a Icterohaemorrhagiae.

Palavras-chave: Cães; caprinos; cavalo; leptospirose; soroaglutinação microscópica (MAT), ovelha.

CHAPTER THREE - Antibodies against *Leptospira* spp. in serum samples of canine, equine and other species analyzed from 2007 to 2015 from different Brazilian states

ABSTRACT

Serum samples of 3,559 canine, equine, goats, sheep, swine species were analyzed by the microscopic agglutination test (MAT) for leptospirosis diagnosis, and the frequency of reactors was 31.35%. In dogs, 23.93% of the samples reacted in the MAT, and the serovar Canicola was the most frequent (35.37%). Among the samples with information about the origin, 99.8% were from São Paulo State. Of the equine specie samples, 46.95% were reactors in the MAT, and serovar Icterohaemorrhagiae was the most frequent (82.9%). In regard of the samples with registry of origin, 100% of the samples from the Federal District were reactive, and from São Paulo 1.651 samples were received, a frequency of 46.85%. The proportions of reactors in sheep, goats and pigs, were 7.33%, 1.30% and 6.03%, respectively, and the most frequent serovar was Icterohaemorrhagiae.

Key words: Dogs; goats; horse; leptospirosis; Microscopic agglutination test (MAT), sheep.

1.INTRODUÇÃO

A leptospirose é ocasionada por bactérias do gênero *Leptospira*, que possuem grande capacidade de infectar e sobreviver em diversos hospedeiros mamíferos, que podem atuar como hospedeiros de manutenção de algumas sorovarietades deste microrganismo (LEVETT, 2001; ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010; CAMERON, 2015).

Tanto os animais selvagens como os domésticos podem atuar como reservatórios da *Leptospira*, principalmente roedores e pequenos marsupiais, bovinos, suínos e cães. Mundialmente já foi demonstrado que a maioria dos mamíferos terrestres e aquáticos, bem como os marsupiais, atuam como reservatórios deste agente (LEVETT, 2001; ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010).

Os componentes centrais para a persistência e epidemiologia da leptospirose são os portadores renais, uma vez que a infecção crônica dos túbulos renais é responsável pela eliminação do agente através da urina e, desta forma, são responsáveis pela contaminação de solos e fontes de água (ADLER; PEÑA-MOCTEZUMA, 2010).

Estudos de prevalência e isolamentos realizados em equinos indicam que tais animais são susceptíveis à infecção pelos sorogrupos Grippotyphosa, Sejroe, Pomona (sorovariedade Kennewicki) e Icterohaemorrhagiae (ELLIS, 2015). Em trabalho realizado por Yan et al. (2010), equinos foram infectados experimentalmente por *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki e apresentaram leptospiremia de 2 a 6 dias após a infecção e leptospiúria 4 semanas pós-infecção, demonstrando a importância dos portadores renais na disseminação da doença.

A espécie canina também é importante para a epidemiologia da leptospirose devido a sua relação próxima aos seres humanos. Tais animais são hospedeiros de manutenção da sorovariedade Canicola, cuja prevalência vem caindo em diversos países, principalmente devido à vacinação desses animais. O sorogrupo Icterohaemorrhagiae é importante em casos de infecção acidental, e diversos estudos também mostram que o sorogrupo Bratislava é mantido pelos cães em diversas partes do mundo. No Brasil, as sorovarietades Canicola e Icterohaemorrhagiae são as principais responsáveis pela infecção nos cães (OLIVEIRA et al., 2012; ELLIS, 2015).

A ocorrência de leptospirose humana está ligada principalmente a atividades ocupacionais (como agricultura e produção animal), e levando em consideração a proximidade do ser humano a diversas espécies animais, o objetivo deste trabalho foi

avaliar a frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em exames de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose canina, equina, caprina, ovina e suína realizados na rotina do Laboratório de Brucelose e Leptospirose entre os anos de 2007 e 2015, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Câmpus Jaboticabal – SP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste trabalho realizou-se o levantamento dos resultados dos exames de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose canina, caprina, equina, ovina e suína efetuados durante a rotina do Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose (LabLepBru), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV, Unesp, Câmpus Jaboticabal-SP, compreendendo os anos de 2007 a 2015.

As informações analisadas foram tabuladas a partir dos registros salvos no banco de dados do LabLepBru, sendo considerados os parâmetros: data de entrada das amostras, data da realização dos exames, município de origem, espécie animal, sexo e os resultados da MAT (título e interpretação).

Os antígenos de *Leptospira* spp. utilizados nos testes sorológicos foram repicados semanalmente em meio de cultura líquido EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris), tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear, e mantidos em estufa bacteriológica BOD a 29°C ±1°C (OIE, 2014).

As sorovarietades de *Leptospira* spp. utilizadas no teste de soroaglutinação microscópica foram: Autumnalis, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi, Wolffi.

As amostras de soro sanguíneo foram diluídas em solução salina, sendo a diluição inicial 1/50. Alíquotas de 25 µL foram colocadas em placas de poliestireno, com fundo chato, e adicionada igual quantidade de antígeno, de nove sorovarietades de *Leptospira* spp., resultando na diluição 1/100. A mistura de soro-antígeno foi levemente homogeneizada e incubada em estufa BOD à temperatura de 28°C por 40 a 120 minutos, procedendo-se a seguir à leitura em microscopia de campo escuro (microscópio Zeiss – Axio Imaginer A1), com objetiva e ocular de 10x, diretamente nos poços da placa.

Foram consideradas reagentes as amostras em que ocorreu 50% de aglutinação, estando metade das leptospiros aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. As amostras reagentes na diluição inicial foram testadas com diluições seriadas de razão dois, sendo a primeira diluição 1/100, conforme a recomendação da OIE (2014).

Para a análise estatística dos dados, foram desconsiderados os resultados das amostras com títulos iguais contra uma ou mais sorovariedades na MAT. Os resultados das frequências encontradas entre as variáveis estudadas (sexo) foram analisados por meio do teste do qui-quadrado ou do teste exato de Fisher, usando o software R (R CORE TEAM, 2003). O intervalo de confiança (IC) das frequências de reagentes observadas foi calculado utilizando a metodologia preconizada por Thrusfield (2005). Para a confecção dos mapas temáticos foi utilizado o software TerraView (TERRAVIEW, 2010).

3. RESULTADOS

Foram analisadas 3.559 amostras de soro das espécies canina (819), equina (1.855), caprina (230), ovina (532) e suína (123) (Figura 1). Destas, 1.116 (31,35%) foram reagentes no teste de soroglutinação microscópica (MAT), contra uma ou mais sorovariedades de *Leptospira* spp.

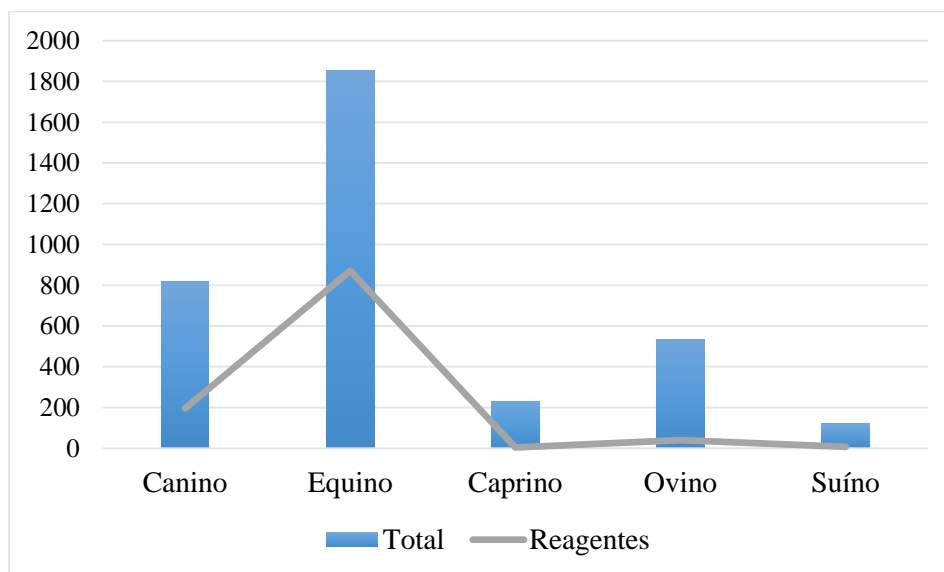


Figura 1. Distribuição total das amostras de soro canino, equino, caprino, ovino e suíno em relação ao total de amostras reagentes no teste de sorologia microscópica para diagnóstico de leptospirose durante a análise entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Foram recebidas ao todo 819 amostras de soro canino para serem analisadas e, destas, 196 (23,93; IC 95%= 21,01 - 26,85) foram reagentes contra uma ou mais sorovarietades de *Leptospira* spp. Os dados em relação ao ano e à frequência de reagentes estão representados na Tabela 1.

Do total de amostras recebidas, somente 813 (99,2%) continham em suas fichas o estado e a cidade de origem (Anexo 3). Dos estados de Mato Grosso do Sul e Minas Gerais foi recebida apenas uma amostra, e as restantes, 811 (99,8%), foram provenientes do Estado de São Paulo (Figura 2).

Tabela 1. Frequência de amostras de soro canino reagentes contra *Leptospira* spp. em relação ao ano em que foram analisadas, no período de 2007 a 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Ano	Animais		Frequência (%)	IC 95% (%)
	Analisados	Reagentes		
2007	22	4	18,18	7,31 - 38,52
2008	30	7	23,33	11,79 - 40,93
2009	21	3	14,29	4,98 - 34,64
2010	150	19	12,67	7,34 - 17,99
2011	126	30	23,81	16,37 - 31,25
2012	97	20	20,62	12,57 - 28,67
2013	92	22	23,91	15,20 - 32,63
2014	129	43	33,33	25,20 - 41,47
2015	152	48	31,58	24,19 - 37,97
Total	819	196	23,93	21,01 - 26,85

IC: Intervalo de Confiança

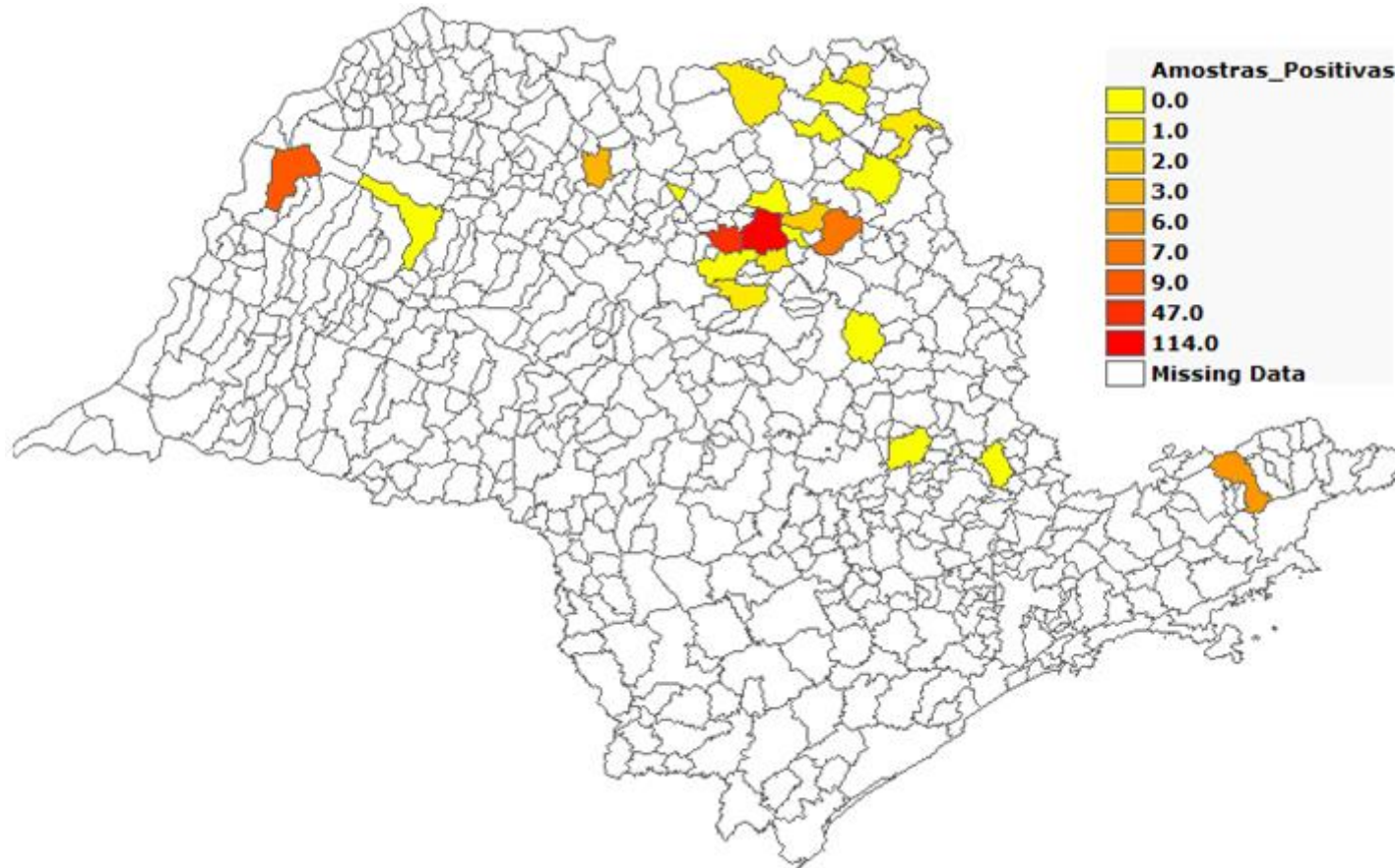


Figura 2. Mapa do Estado de São Paulo mostrando a distribuição das amostras reagentes no teste de soroglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose canina em relação aos municípios analisados entre os anos de 2007 e 2015 Jaboticabal, SP, 2016

Dentre as 196 amostras reagentes, 164 (%) reagiram contra apenas uma sorovariedade de *Leptospira* spp. e 32 (%) reagiram contra duas ou mais. A sorovariedade *Canicola* (35,37%) apresentou a maior frequência na MAT, seguida das sorovarietades *Grippotyphosa* (34,76%) e *Copenhageni* (15,85%). Os títulos das amostras variaram de 100 a 3.200, e os de maior ocorrência foram 200 e 100, com 61 (37,2%) e 59 (36%), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Número de reações conforme o título de aglutininas contra as sorovarietades utilizadas no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, entre as 164 amostras soro canino reagentes, no período de 2007 a 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Sorovarietades	Título					Total	
	100	200	400	800	3200	N	%
Autumnalis	0	1	0			1	0,61
Canicola	23	17	9	8	1	58	35,37
Copenhageni	13	6	6	1		26	15,85
Grippotyphosa	19	26	4	8		57	34,76
Hardjo	0	0	1			1	0,61
Icterohaemorrhagiae	1	7	2	1		11	6,71
Pomona	2	1	3			6	3,66
Tarassovi	1	1	0			2	1,22
Wolffi	0	2	0			2	1,22
Total	59 (36%)	61 (37,2%)	25 (15,2%)	18 (11%)	1 (0,6%)	164	100

N: número de animais reagentes em cada título de aglutininas

#: porcentagem de animais reagentes em cada título de aglutininas em relação ao total de animais positivos

Somente 623 (76,06%) das amostras de soro canino possuíam em suas fichas a informação em relação ao sexo dos animais. Destes, 322 (51,7%) eram do sexo feminino e 301 (48,3%) eram do sexo masculino. A frequência encontrada em animais do sexo feminino foi 25,78%, e para o sexo masculino, 36,2%, não havendo diferença significativa entre essas proporções (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em soro canino em relação ao sexo, nas amostras enviadas para análise entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

	Analizados	Reagentes	Frequência (%)	IC 95% (%)	X²	Valor P
Fêmea	322	83	25,78	20,10 - 30,55	0,0186	0,8916
Macho	301	80	36,20	29,86 - 42,54		

IC: Intervalo de Confiança

Já em relação às amostras de soro equino, foram recebidas ao todo 1.855 e, destas, 871 (46,95%; IC 95%= 44,68% – 49,23%) foram reagentes contra uma ou mais sorovarietades de *Leptospira* spp. Os dados em relação ao ano e à frequência de reagentes estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Frequência de amostras de soro equino reagentes contra *Leptospira* spp em relação ao ano em que as amostras analisadas, no período de 2007 a 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Ano	Amostras		Frequência (%)	IC 95% (%)
	Analisadas	Reagentes		
2007	232	94	40,52	34,20 - 46,83
2008	535	260	48,60	44,36 - 52,83
2009	268	119	44,40	38,45 - 50,35
2010	100	17	17,00	9,64 - 24,36
2011	93	42	45,16	35,05 - 55,28
2012	103	60	58,25	48,76 - 67,78
2013	257	118	45,91	39,82 - 52,01
2014	125	79	63,20	54,75 - 71,65
2015	142	82	57,75	49,62 - 65,87
Total	1.855	871	46,95	44,68 - 49,23

IC: Intervalo de Confiança

Dentre as 871 amostras reagentes, 789 (90,6%) reagiram contra apenas uma sorovariedade de *Leptospira* spp. e 82 (9,4%) reagiram contra duas ou mais. A sorovariedade Icterohaemorrhagiae (82,9%) apresentou a maior frequência na MAT, seguida das sorovarietades Copenhageni (5,07%) e Grippotyphosa (4,06%). Os títulos das amostras variaram de 100 a 800 e os de maior ocorrência foram 100 e 200, com 342 (43,5%) e 312 (39,5%), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Número de reações conforme o título de aglutininas contra as sorovarietades utilizadas no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, entre as 789 amostras soro equino reagentes, no período de 2007 a 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Sorovarietades	Título				Total	
	100	200	400	800	N	%
Canicola	0	4	1	1	6	0,76
Copenhageni	17	16	5	2	40	5,07
Grippotyphosa	9	15	5	3	32	4,06
Hardjo	9	8	3	1	21	2,66
Icterohaemorrhagiae	300	252	75	27	654	82,9
Pomona	2	4	1	2	9	1,14
Tarassovi	2	4	0	1	7	0,89
Wolffi	4	9	5	2	20	2,53
Total	343 (43,5%)	312 (39,5%)	95 (12%)	39 (5%)	789	100

N: número de animais reagentes em cada título de aglutininas

%; porcentagem de animais reagentes em cada título de aglutininas em relação ao total de animais positivos

Somente 818 (44,1%) das amostras possuíam em suas fichas a informação em relação ao sexo dos animais. Destes, 667 (81,6%) eram do sexo feminino e 151 (18,4%) eram do sexo masculino. A frequência de amostras reagentes encontrada nos animais do sexo feminino foi 53,07%, e para o sexo masculino, 41,06%, havendo diferença significativa entre as duas proporções (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em soro equino em relação ao sexo das amostras enviadas para análise entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

	Analizados	Reagentes	Frequência (%)	IC 95% (%)	X ²	Valor P
Fêmea	667	354	53,07	49,29 - 56,86	6,638	0,009983
Macho	151	62	41,06	33,21 - 48,91		

IC: Intervalo de Confiança

Das amostras de soro equino recebidas, somente 1.799 (96,2%) continham em suas fichas o estado de origem, sendo eles: Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo. O Estado de São Paulo (Figura 3) apresentou o maior número de amostras enviadas neste período (1.651), com frequência de reagentes de 46,85% (IC 95%= 44,45% – 49,26%), e a sorovariedade mais frequente foi a *Icterohaemorrhagiae*. Já em relação à frequência de amostras reagentes, 100% das amostras recebidas do Distrito Federal foram positivas na MAT, assim como 80% das amostras recebidas do Estado do Paraná foram reativas no teste. As informações dos demais estados estão descritas na tabela 7.

Tabela 7. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em soro equino em relação ao estado de origem das amostras enviadas para análise entre os anos de 2007 e 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Estados	Amostras		Frequência (%)	IC 95% (%)
	Analizados	Reagentes		
DF	12	12	100,00	75,75 - 100,00
GO	46	7	15,22	4,84 - 25,60
MG	56	31	57,4	44,22 - 70,60
MS	19	10	52,65	30,18 - 75,08
PR	15	12	80,00	54,81 - 92,95
SP	1.651	774	46,85	44,45 - 49,26
Total	1.799	846	47,05	44,75 - 49,36

X² = 41,3404, 5 GL, P = 8,008x10⁻⁸

IC: Intervalo de Confiança

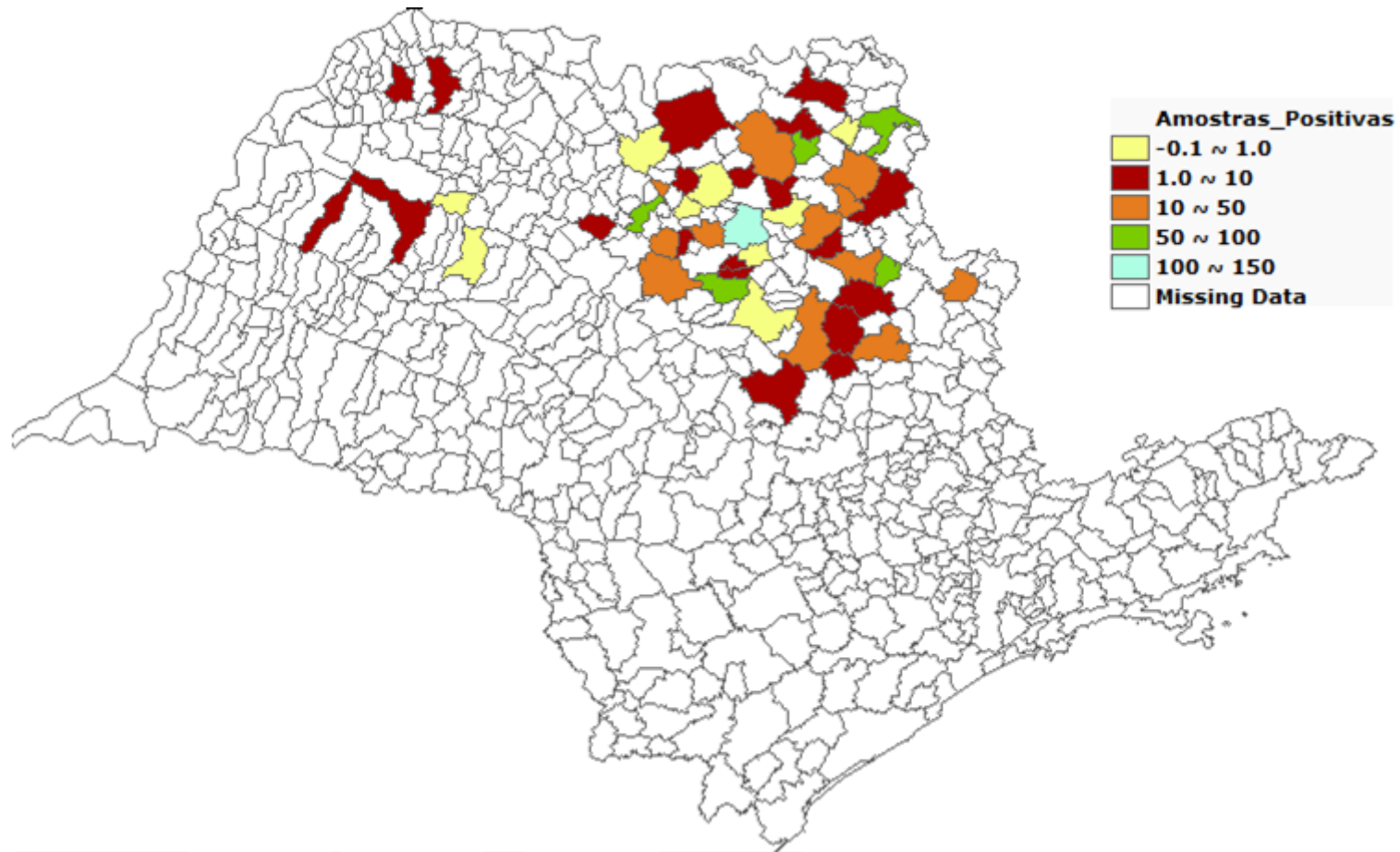


Figura 3. Mapa do Estado de São Paulo mostrando a distribuição das amostras reagentes no teste de soroprecipitação microscópica para diagnóstico de leptospirose equina em relação aos municípios analisados entre os anos de 2007 e 2015 Jaboticabal, SP, 2016.

Em relação às espécies caprina, ovina e suína, foram recebidas 885 amostras de soro no total. Dentre as amostras da espécie caprina, somente 3 (1,30% - IC 95%= 0,0044% - 3,764%) foram reagentes. Na espécie ovina, 39 amostras (7,33% - IC 95%= 5,12% - 9,55%) foram positivas, enquanto 7 amostras de soro suíno (6,03% - IC 95%= 1,70% - 10,37%) foram positivas. Para as três espécies, a sorovariedade *Icterohaemorrhagiae* foi a mais frequente (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em relação às amostras de soro das espécies caprina, ovina e suína enviadas para análise, no período de 2007 a 2015, Jaboticabal, SP, 2016.

Espécie	Amostras		Frequência (%)	IC 95% (%)	Sorovariedade
	Analisadas	Reagentes			
Caprina	230	3	1,30	0,0044 - 3,764	<i>Icterohaemorrhagiae</i> (66,6%)
Ovina	532	39	7,33	5,12 - 9,55	<i>Icterohaemorrhagiae</i> (61,55%)
Suína	123	7	6,03	1,70 - 10,37	<i>Icterohaemorrhagiae</i> (100%)

IC: Intervalo de Confiança.

4. DISCUSSÃO

Os hospedeiros de manutenção da *Leptospira* spp. possuem um importante papel na epidemiologia da leptospirose, uma vez que contribuem para a sobrevivência e disseminação do agente, uma vez que adquirem o estado de portador e principalmente por serem, na maioria dos casos, animais assintomáticos (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003).

No presente trabalho, a sorovariedade *Canicola* foi a mais frequente dentre as amostras reagentes de soro canino, com 35,37%. Tal sorovariedade é reconhecida mundialmente por ter a espécie canina como seu principal hospedeiro de manutenção (ELLIS, 2015), e no Brasil, diversos são os estudos que apontam a presença de títulos contra *Canicola* com frequências que variam de 10% até 60% (RODRIGUES et al., 2007; CASTRO et al., 2015; MORIKAWA et al., 2015).

Outra sorovariedade que se destacou nos resultados do MAT na espécie canina foi a *Grippothyphosa*, com frequência de 34,76% nas amostras reagentes. No Brasil, ainda

não existem relatos a respeito do isolamento e caracterização molecular desta sorovariedade, entretanto, diversos estudos apontam a presença anticorpos contra *Grippothyphosa* em cães (RODRIGUES et al., 2007; CASTRO et al., 2015; MORIKAWA et al., 2015). A presença de resultados positivos para *Grippothyphosa* pode estar ligada à imunidade nos casos de leptospirose, que é predominantemente humoral, induzida pelos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa da bactéria, podendo ser completa para sorovariiedades homólogas e apenas parcial para sorovariiedades heterólogas (LEVETT, 2001; MINKE et al., 2009).

A sorovariedade *Icterohaemorrhagiae* foi a mais frequente entre as espécies caprina (66,6%), ovina (61,55%) e suína (100%), no presente trabalho. Em revisão realizada por Higino e Azevedo (2014) a respeito da leptospirose em pequenos ruminantes, esta sorovariedade foi apontada como a de maior ocorrência entre ovinos e caprinos. Já em criações suínas, existem evidências de que a frequência de *Icterohaemorrhagiae* vem aumentando em detrimento da sorovariedade *Pomona*, cujo principal hospedeiro de manutenção é o suíno (FÁVERO et al., 2002; VALENÇA et al., 2013).

Na espécie equina, a sorovariedade *Icterohaemorrhagiae* também apresentou a maior frequência entre as amostras reagentes, com 82,89%. Em diversos estudos realizados em equinos originados de diversos estados brasileiros, tal sorovariedade também apresentou alta frequência entre as amostras analisadas (COIRO et al., 2012; SANTOS, 2014; FURQUIM, SANTOS e MATHIAS, 2015).

Em seguida, a sorovariedade *Copenhageni*, pertencente ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, apresentou frequência de 5,07%. Em pesquisa realizada por Hammond et al. (2012), 71% das amostras equinas analisadas apresentaram reação contra esta sorovariedade, enquanto no estudo de Coiro et al. (2012) a frequência encontrada foi de 3,9%.

O sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (sorovariiedades *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*) é apontado como o principal causador da doença na espécie equina (HAMMOND et al., 2012) e possui como seu principal hospedeiro de manutenção os roedores sinantrópicos, principalmente o *Rattus norvegicus* (ELLIS, 2015). A alta ocorrência deste sorogrupo encontrada nas espécies estudadas no presente trabalho sugere a presença de roedores nos ambientes de criação desses animais, evidenciando a importância da implantação de programas de controle de roedores como parte das práticas de manejo das criações.

Os títulos 100 ou 200 indicam a existência de infecção recente em relação ao teste, bem como a presença de anticorpos vacinais (PICARDEAU, 2013). Já títulos superiores a 400 são considerados como indicativos de infecção atual, na presença de sintomatologia clínica e correto histórico animal (FAINE et al., 1999).

Em relação às amostras de soro canino, os títulos de 100 e 200 encontrados correspondem a 73,2% do total de amostras, enquanto os títulos entre 400 e 3.200 correspondem a 26,8%. A maioria das amostras de soro canino foram encaminhadas por clínicas ou hospitais veterinários, indicando a presença de suspeita clínica, porém não constava nas respectivas fichas a informação sobre o estado vacinal dos cães.

Já em relação às amostras de soro equino, os títulos de 100 e 200 encontrados correspondem a 83% do total de amostras, enquanto os títulos 400 e 800 correspondem a 17%. Tais amostras de soro equino provinham tanto de haras como de propriedades particulares, porém em suas fichas não havia informações a respeito do motivo do envio das amostras, nem do estado vacinal dos animais.

As vacinas comerciais contra leptospirose canina disponíveis atualmente contêm principalmente as soroviedades Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona. Em algumas delas também é possível encontrar as soroviedades Copenhageni e Bratislava. Já em relação à vacinação da espécie equina contra a leptospirose, são encontradas no mercado vacinas com até 12 soroviedades de *Leptospira*, entretanto, a vacinação desses animais contra tal doença não é tão frequente quanto nas outras espécies. Desta forma, a alta frequência de títulos superiores a 400, tanto na espécie canina (26,8%) quanto na espécie equina (17%), indica que tais animais não estão sendo vacinados ou as vacinas utilizadas não foram capazes de induzir imunidade neles.

Quando as soroviedades são observadas separadamente, é possível verificar que Copenhageni e Icterohaemorrhagiae apresentaram um número significativo de animais com títulos superiores a 400 (tabela 2 e tabela 5). No Brasil, tais soroviedades estão envolvidas nos casos mais graves de leptospirose humana (BRASIL, 2016), tornando muito importante o seu controle, dada a relação próxima das espécies canina e equina com o ser humano.

5. CONCLUSÃO

Dentre as espécies equina, caprina, ovina e suína, o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* foi o mais frequente, evidenciando a falta de controle de roedores nos ambientes onde estes animais viviam. Já a sorovariedade *Canicola* foi a mais frequente na espécie canina, seus hospedeiros de manutenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BHARTI, A.; NALLY, J.; RICALDI, J.; MATTHIAS, M.; DIAZ, M.; LOVETT, M.; LEVETT, P.; GILMAN, R.; WILLIG, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.

BRASIL. **Informações Técnicas (Leptospirose)**. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas>> Acessado em: 05 de dezembro de 2016.

CAMERON, C. E. Leptospiral structure, physiology and metabolism. In: ADLER, B. ***Leptospira and Leptospirosis***, Springer Berlin Heidelberg, 2015. 295p. p. 21 – 42.

CASTRO, J. R.; SOUZA, M. A.; NETO, A. B. C.; MOREIRA, R. Q.; SALABERRY, S. R. S.; GUIMARÃES, E. C.; LIMA, A. M. C. Presence of antibodies against *Leptospira* spp. in dogs of Uberlândia, MG, Brazil. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 4, p. 1183 – 1188, 2015.

COIRO, C. J.; LANGONI, H.; SILVA, R. C. Epidemiological aspects in the *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* infection in horses in Botucatu, São Paulo, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 620 – 623, 2012.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. In: ADLER, B. ***Leptospira and Leptospirosis***, Springer Berlin Heidelberg, 2015. 295p. p. 99 – 138.

FÁVERO, 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.

FURQUIM, M. E. C.; SANTOS, R. F.; MATHIAS, L. A. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em equídeos abatidos em frigorífico exportador do estado de Minas Gerais. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 55, 2015.

HAMMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 1927 – 1930, 2012.

HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.1, p. 86-94, 2014.

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

MINKE, J. M.; BEY, R.; TRONEL, J. P.; LATOUR, S.; COLOMBET, G.; YVOREL, J.; CARIOU, C.; GUIOT, A. L.; COZETTE, V.; GUIGAL, P. M. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bivalent inactivated leptospirosis vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 137 – 145, 2009.

MORIKAWA, V. M.; BIER, D.; PELLIZZARO, M.; ULLMAN, L. S.; PAPLOSKI, I. A. D.; KIKUTI, M.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B. Seroprevalence and seroincidence of *Leptospira* infection in dogs during a one-year period in an endemic urban area in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 50 – 55, 2015.

OIE – World Organization for Animal Health. **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals**. 2014. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf>. Acesso em: 26 de novembro de 2015.

OLIVEIRA, S. T.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P.; STEDILE, R.; DALMOLIN, M. L.; GUIMARAES, A. M. S.; MOHAMED, A. S.; RIEDIGER, I. N.;

GONZALEZ, F. H. D. Exposure to *Leptospira* spp. in sick dogs, shelter dogs and dogs from an endemic area: points to consider. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 3, p. 1 – 7, 2012.

R CORE TEAM (2003). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://R-project.org/>>.

RODRIGUES, A. M. A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAES, Z. M.; HAGIWUARA, M. K. Isolamento de *Leptospira* spp de cães com diagnóstico clínico de leptospirose em São Paulo (Brasil). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 705 – 706, 2007.

SANTOS, R. F. **Anticorpos contra *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em equídeos da região Sul do Brasil abatidos em matadouro-frigorífico**. 2014. 59f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus Jaboticabal, São Paulo. 2014.

TERRAVIEW 4.1.0. São José dos Campos, SP: INPE, 2010. Disponível em: www.dpi.inpe.br/terraview. Acesso em: 1 de outubro de 2016.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. 3 ed. Oxford: Balckwell Science, 2005. 610p.

VALENÇA, R. M. B.; MOTA, R. A.; CASTRO, V.; ANDERLINI, G. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; BRANDESPIM, D. F.; VALENÇA, S. R. F. A.; GUERRA, M. M. P. Prevalence and risk factors associated with *Leptospira* spp. infection in technified swine farms in the State of Alagoas, Brazil: risk factors associated with *Leptospira* spp. in swine farms. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 79 – 86, 2013.

YAN, W.; FAISAL, S. M.; DIVERS, T.; McDONOUGH, S. P.; AKEY, B.; CHANG, Y. F. Experimental *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki infection of horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 912 – 917, 2010.

CAPÍTULO QUATRO – Considerações Finais

Durante o período analisado, foram recebidas aproximadamente 28 mil amostras de soro de diferentes espécies (bovina, canina, equina, caprina, ovina e suína), oriundas de diferentes estados do Brasil, para a realização de diagnóstico de leptospirose, permitindo observar a presença de amostras reagentes em todos os anos e espécies analisadas, evidenciando o caráter endêmico da doença.

Uma vez que a *Leptospira* é conhecida por sua capacidade de infectar diversas espécies mamíferas e por comumente não produzir sintomatologia clínica em hospedeiros adaptados, que passam a atuar como a principal fonte de infecção da doença, é errôneo falar de sua erradicação. Em contrapartida, é possível realizar o controle da leptospirose com a adoção de medidas profiláticas, que podem ser direcionadas a partir do conhecimento dos sorogrupos infectantes.

No presente trabalho, tanto as amostras de soro bovinas quanto as de cães apresentaram maior frequência de reagentes a sorogrupos dos quais são os principais hospedeiros de manutenção (sorogrupo Sejroe e Canicola, respectivamente). Já nas espécies equina, caprina, ovina e suína, o sorogrupo mais relevante foi o Icterohaemorrhagiae, cujos hospedeiros de manutenção são os roedores sinantrópicos. Desta forma, é possível indicar a melhor forma para realizar a contenção da doença nas regiões/rebanhos que tiveram amostras examinadas, seja pela vacinação dos animais, no caso dos sorogrupos Sejroe e Canicola, seja pelo controle dos roedores que circundam os ambientes onde os animais são criados, como no caso do sorogrupo Icterohaemorrhagiae.

Desta forma, é fundamental que levantamentos sorológicos continuem sendo realizados, uma vez que o conhecimento da situação epidemiológica da leptospirose nas regiões e/ou animais estudados permite que as medidas de controle cabíveis para cada situação sejam tomadas, contribuindo para a diminuição das perdas econômicas devidas a abortamentos, queda na produção de leite e gastos com medicamentos, bem como para a redução da incidência da doença tanto nos animais domésticos quanto nos seres humanos.

ANEXO 1 – Lista dos municípios do Estado de São Paulo com amostras bovinas enviadas para diagnóstico de leptospirose no período de 2007 a 2015, utilizada para a confecção dos mapas temáticos, Jaboticabal, 2016.

Municípios	Reagentes	Negativo	Total
Altinópolis	5	3	8
Álvares Florence	0	4	4
Amparo	0	8	8
Andradina	36	67	103
Araçatuba	88	115	203
Arapeí	2	5	7
Aspásia	0	14	14
Atibaia	1	3	4
Auriflama	114	61	175
Avanhandava	0	3	3
Bady Bassit	0	1	1
Barretos	27	57	84
Barrinha	0	11	11
Batatais	176	503	679
Bebedouro	19	49	68
Birigui	32	88	120
Bocaiana	12	13	25
Borborema	9	17	26
Bragança Paulista	2	10	12
Brodoswki	4	6	10
Buritama	2	21	23
Buritizal	1	30	31
Cachoeira Paulista	0	7	7
Cafelândia	0	2	2
Cajobi	6	42	48
Cajuru	88	176	264
Campinas	0	35	35
Cândido Rodrigues	9	6	15
Cássia dos Coqueiros	0	8	8
Castilho	1	3	4
Cedral	0	5	5
Colombia	0	2	2
Cravinhos	25	32	57
Cristais Paulista	1	17	18
Cruzeiro	1	4	5
Descalvado	9	42	51
Elisiano	0	4	4

Continua...

...Continuação

Estrela D'Oeste	0	1	1
Fatura	4	16	20
Fernando Prestes	2	1	3
Fernandópolis	5	17	22
Floreal	5	5	10
Franca	44	95	139
Garça	0	1	1
General Salgado	5	17	22
Guaira	38	99	137
Guapiaçu	0	1	1
Guará	24	25	49
Guarantã	4	5	9
Guararapes	0	2	2
Guariba	66	44	110
Ibirá	0	5	5
Ibitinga	4	6	10
Indiaporã	2	3	5
Ipuã	10	26	36
Itápolis	61	108	169
Itapuã	0	1	1
Itirapuã	26	27	53
Ituverava	172	337	509
Jaboticabal	35	267	302
Jaci	0	2	2
Jales	13	6	19
Jeriquara	2	2	4
José Bonifácio	5	1	6
Lavínia	0	8	8
Limeira	1	0	1
Lins	1	4	5
Lorena	1	14	15
Lucélia	6	4	10
Lucianópolis	1	0	1
Luis Antônio	0	2	2
Matão	0	1	1
Miguelópolis	2	19	21
Mira Estrela	0	1	1
Mirassol	9	13	22
Mococa	29	25	54

Continua...

...Continuação

Monções	0	10	10
Monte Alegre do Sul	0	3	3
Monte Alto	2	14	16
Monte Azul Paulista	81	49	130
Monte Mor	0	5	5
Morro Agudo	49	363	412
Murutinga do Sul	4	7	11
Nova Canaã Paulista	1	12	13
Nova Luzitânia	3	14	17
Nova Odessa	10	0	10
Novo Horizonte	0	27	27
Nuporanga	12	13	25
Orlândia	51	18	69
Oscar Brenasse	27	23	50
Palestina	0	3	3
Palmeira do Oeste	1	0	1
Paraíba	2	0	2
Patrocínio Paulista	113	282	395
Paulínia	16	159	175
Pedregulho	18	52	70
Penápolis	138	96	234
Piquete	0	1	1
Piraju	0	21	21
Pirajuí	3	0	3
Pirangui	3	10	13
Pitangueiras	39	54	93
Planalto	0	9	9
Poloni	0	1	1
Pontalinda	1	3	4
Populina	3	16	19
Potim	5	8	13
Pradópolis	6	28	34
Presidente Prudente	64	174	238
Presidente Venceslau	2	4	6
Promissão	7	15	22
Queiroz	3	2	5
Rancharia	1	1	2
Restinga	0	23	23
Ribeirão Bonito	3	5	8
Ribeirão Preto	1	4	5

Continua...

...Continuação

Rio Claro	8	5	13
Riolândia	32	60	92
Rubinéia	197	138	335
Sales de Oliveira	0	11	11
Santa Cruz das Palmeiras	3	3	6
Santa Fé do Sul	11	10	21
Santa Rita D'Oeste	236	481	717
Santa Rita do Passa Quatro	13	19	32
Santa Rosa do Viterbo	27	58	85
Santo Anastácio	1	9	10
Santo Antônio da Alegria	21	47	68
Santo Antônio do Acaranguá	21	2	23
São Carlos	24	350	374
São Francisco Sales	0	29	29
São João da Boa Vista	16	69	85
São João das Duas Pontas	1	0	1
São Joaquim da Barra	3	16	19
São José Barreiro	2	2	4
São José da Boa Vista	12	27	39
São José do Rio Pardo	54	110	164
São José do Rio Preto	12	17	29
São Paulo	4	8	12
São Simão	6	26	32
Sarapuí	0	32	32
Serrana	6	32	38
Sertãozinho	1.551	3.278	4.829
Taiacu	1	0	1
Taiúva	80	134	214
Tambaú	7	24	31
Taquaritinga	9	11	20
Torrinha	0	12	12
Uchoa	0	2	2
Urania	7	8	15
Urupês	0	1	1
Valparaíso	5	5	10
Vinhedo	0	1	1
Viradouro	6	26	32
Vitória Brasil	10	46	56
Vista Alegre do Alto	0	1	1
Votuporanga	11	4	15
Zacarias	0	1	1

ANEXO 2 - Lista dos municípios do Estado de Minas Gerais com amostras bovinas enviadas para diagnóstico de leptospirose no período de 2007 a 2015, utilizada para a confecção dos mapas temáticos, Jaboticabal, 2016.

Municípios	Reagentes	Negativos	Total
Abadia dos Dourados	6	16	22
Abaeté	1	12	13
Águas Vermelhas	4	5	9
Alfenas	0	6	6
Alpinópolis	28	39	67
Arceburgo	0	3	3
Augusto de Lima	11	7	18
BambuÍ	20	59	79
Bocaiúva	18	44	62
Bom Despacho	28	13	41
Bom Jesus da Penha	1	6	7
Brazópolis	2	0	2
Buritizeiro	20	6	26
Cabeceira Grande	4	7	11
Campina Verde	26	32	58
Campos Altos	4	6	10
Capitão Andrade	0	3	3
Capitão Enéas	0	3	3
CaraÍ de Minas	1	9	10
Carlos Chagas	4	25	29
Carmo do ParanaÍba	28	46	74
Carneirinho	25	1	26
Cássia	13	37	50
Claraval	29	41	70
Comendador Gomes	0	2	2
Coromandel	23	15	38
Córrego Dantas	2	3	5
Cruzília	0	20	20
Cumbuquira	0	5	5
Cuparaque	2	7	9
Dores do Indaiá	3	7	10
Elói Mendes	4	36	40
Espera Feliz	6	9	15
Espirito Santo do Dourado	6	6	12
Frutal	12	25	37
Governador Valadares	13	10	23
Guaraná	6	6	12
Guimarania	4	26	30

Continua...

...Continuação

Gurinhata	45	73	118
Ibiá	2	23	25
Ibiraci	29	34	63
Iguatama	0	6	6
Ingaí	1	4	5
Itagipe	12	14	26
Itamonte	0	12	12
Ituiutaba	19	35	54
Iturama	17	25	42
Jacutinga	3	37	40
Jesuânia	14	58	72
Juiz de Fora	4	0	4
Juramento	7	16	23
Lagoa da Prata	2	3	5
Lavras	29	154	183
Limeira do Oeste	2	10	12
Luz	10	10	20
Matutina	3	18	21
Medeiros	2	10	12
Moema	12	0	12
Monte Alegre	7	13	20
Monte Carmelo	6	25	31
Monte Sião	3	12	15
Montes Claros	167	117	284
Nepomucemo	0	2	2
Passos	31	106	137
Patos de Minas	16	55	71
Pratápolis	22	42	64
Patrocínio	43	35	78
Perdizes	46	107	153
Perdões	8	4	12
Pescador	4	2	6
Pironguinho	0	4	4
Pitangui	0	70	70
Piumhi	0	4	4
Pompeu	47	117	164
Potim	2	8	10
Prata	98	199	297
Raul Soares	2	4	6
Resplendor	2	24	26

Continua...

...Continuação

Salinas	16	4	20
Santa Rita do Sapucaí	2	1	3
Santa Vitória	37	41	78
Santo Antônio do Monte	36	78	114
São Francisco	14	1	15
São Francisco Sales	4	8	12
São Gonçalo do Ibaté	12	62	74
São Gotardo	3	20	23
São João Batista da Glória	1	33	34
São Pedro da União	0	4	4
São Roque de Minas	7	14	21
São Sebastião do Paraíso	0	19	19
Serra do Salitre	13	26	39
Sete Lagoas	4	1	5
Teófilo Otoni	3	12	15
Três Corações	0	5	5
Uberaba	8	11	19
Uberlândia	14	0	14
Unai	18	25	43
Vazante	0	35	35
Veríssimo	22	24	46

ANEXO 3 - Lista dos municípios do Estado de São Paulo com amostras caninas enviadas para diagnóstico de leptospirose no período de 2007 a 2015, utilizada para a confecção dos mapas temáticos, Jaboticabal, 2016.

Municípios	Positivo	Negativo	Total
Amparo	0	1	1
Andradina	9	91	100
Araçatuba	0	2	2
Barrinha	0	1	1
Batatais	1	1	2
Buritizal	1	0	1
Descalvado	0	3	3
Embaúba	0	1	1
Franca	1	10	11
Guaíra	1	1	2
Guaratinguetá	6	26	32
Guariba	1	3	4
Ituverava	0	6	6
Jaboticabal	114	294	408
Limeira	0	4	4
Matão	1	1	2
Monte Alto	47	117	164
Pitangueiras	0	7	7
Ribeirão Preto	7	22	29
São Joaquim da Barra	0	1	1
São José do Rio Preto	3	20	23
Sertãozinho	2	3	5
Taquaritinga	0	2	2

ANEXO 4 - Lista dos municípios do Estado de São Paulo com amostras equinas enviadas para diagnóstico de leptospirose no período de 2007 a 2015, utilizada para a confecção dos mapas temáticos, Jaboticabal, 2016.

Municípios	Reagente	Negativo	Total
Altinópolis	1	0	1
Analândia	5	1	6
Araçatuba	1	3	4
Araraquara	0	1	1
Barretos	4	6	10
Batatais	20	15	35
Bebedouro	0	2	2
Bonfim Paulista	10	20	30
Brodowski	19	16	35
Brotas	1	23	24
Buritama	0	3	3
Catanduva	68	62	130
Cravinhos	6	16	22
Descalvado	7	16	23
Dobrada	1	0	1
Embaúba	12	12	24
Fernando Prestes	2	2	4
Fernandópolis	1	0	1
Franca	53	14	67
Guariba	0	3	3
Itápolis	27	17	44
Ituverava	2	2	4
Jaboticabal	102	102	204
Jales	1	0	1
Lavínia	1	0	1
Matão	97	62	159
Monte Alto	15	26	41
Monte Azul Paulista	3	1	4
Morro Agudo	23	11	34
Olímpia	0	1	1
Orlândia	90	100	190
Penápolis	0	1	1
Piranguí	0	2	2
Pirassununga	16	32	48
Pontal	1	0	1
Ribeirão Preto	22	34	56
Santa Adélia	10	14	24
Santa Ernestina	5	6	11
Santa Rita do Passa Quatro	2	10	12
Santa Rosa do Viterbo	69	119	188
São Carlos	15	36	51

Continua...

...Continuação

São Joaquim da Barra	2	26	28
São José da Bela Vista	0	4	4
São José do Rio Preto	47	45	92
São Simão	10	10	20
Sertãozinho	0	1	1
Urupês	2	0	2
Viradouro	1	0	1