

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES ESPERMÁTICAS E DOS NÍVEIS
PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA EM CÃES
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Leptospira*
interrogans sorovar Canicola**

Lucas Alves de Souza Santana
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES ESPERMÁTICAS E DOS NÍVEIS
PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA EM CÃES
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Leptospira*
interrogans sorovar Canicola**

Lucas Alves de Souza Santana

Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Gírio

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2008

Santana, Lucas Alves de Souza
S232a Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona em cães experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola / Lucas Alves de Souza Santana. – – Jaboticabal, 2008
xix, 57 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Raul José Silva Gírio
Banca examinadora: Luís Antônio Mathias, José Rafael Módolo
Bibliografia

1. Leptospirose. 2. Cães. 3. Testosterona. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.7

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS ALVES DE SOUZA SANTANA – nascido em 18 de novembro de 1981, em Jaboticabal – São Paulo, é Médico Veterinário formado pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em dezembro de 2005. Mestrando do curso de pós-graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, durante o período de 2006 e 2007.

Dedico,

Aos meus pais, Aureo e Vanete, pela sabedoria guardada na simplicidade do “ser”, que, com a dedicação, o apoio e o incentivo, ensinaram-me o verdadeiro caminho de uma vida mais humana.

Aos meus irmãos André e Júnior e à sobrinha Laura, pelo carinho, apoio e companheirismo que me dedicaram.

A Deus, pela oportunidade de encontrar pessoas tão especiais em minha vida, que me guiaram até aqui.

Aos animais, que inocentemente foram os principais instrumentos desta etapa de minha vida, pois sem eles nada disto seria possível.

AGRADECIMENTOS

Especialmente, ao Prof. Dr. Raul José Silva Gírio, meus agradecimentos sinceros, não só pela orientação mas também pelo apoio, pela amizade, pela compreensão e pela confiança.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal pela oportunidade concedida.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão de Bolsa de Estudos.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio Mathias, que, mesmo sem as obrigações de orientador, está sempre disposto a prestar eventuais esclarecimentos.

Ao amigo Nivaldo Aparecido de Assis, pelo companheirismo, pela atenção e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Nader Filho e à Prof^a. Dr^a. Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho, pelas correções e sugestões tão oportunas.

À Dr^a. Fernanda Senter Magajevski, pela amizade, pela atenção e pelas correções durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, pela dedicação, pelo carinho e pela amizade, além das sugestões na redação da dissertação.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que sempre me trataram com muito apreço.

À Dr^a. Margareth Elide Genovez, pelo valioso auxílio no fornecimento das cepas utilizadas no experimento.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos e à bióloga Zenaide Maria de Moraes, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas – USP/SP, pelo auxílio na técnica de contagem de leptospiros.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhaim e à Dr^a. Adriana Cortez, do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia Aplicada – USP/SP, pelos ensinamentos na realização da técnica de PCR.

À Dr^a. Priscila Viau, do Laboratório de Dosagens Hormonais – USP/SP, pelos conselhos e pelo auxílio nas dosagens hormonais.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi, pelas sugestões e pela valiosa contribuição durante a realização da técnica de Levaditi.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pela disponibilidade e pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados.

Ao Prof. Halim Attique Netto e à Unirp, pela ajuda na manutenção dos animais e na colheita das amostras.

À amiga Michelle Brich, pelo companheirismo e pela ajuda na colheita das amostras.

Às funcionárias do laboratório de histopatologia do Departamento de Patologia Animal deste câmpus, Maria Inês Yamazaki de Campos e Francisca de Assis Ardisson, pela contribuição no processamento do material e no preparo das lâminas na execução da técnica de Levaditi.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na execução do experimento e na minha formação pessoal e profissional durante a pós-graduação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Origem e seleção dos animais.....	12
3.2. Instalação e manejo dos animais experimentais.....	12
3.3. Constituição dos grupos experimentais.....	12
3.4. Inoculação.....	13
3.5. Colheita das amostras.....	13
3.5.1. Sangue	13
3.5.2. Sêmen	14
3.6. Pesquisa de anticorpos	14
3.6.1. Preparo dos antígenos de leptospira	14
3.6.2. Técnica de soroprecipitação microscópica	14
3.7. Dosagens hormonais	16
3.8. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	16
3.8.1. Extração de DNA	16
3.8.2. Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) empregados na amplificação.....	17
3.8.3. Amplificação do DNA bacteriano	18
3.8.4. Ciclo de amplificação	18
3.8.5. Análise do produto amplificado	19
3.8.6. Amostra de sêmen canino para contaminação experimental	19
3.8.7. Determinação do limiar de detecção da técnica de PCR	19

3.9. Análise dos Ejaculados.....	20
3.9.1. Análises macroscópicas.....	20
3.9.1.1. Volume.....	20
3.9.1.2. Coloração.....	20
3.9.2. Análises microscópicas.....	20
3.9.2.1. Motilidade espermática.....	21
3.9.2.2. Vigor.....	21
3.9.2.3. Concentração espermática.....	21
3.9.2.4. Turbilhonamento.....	21
3.10. Eutanásia dos animais.....	22
3.11. Pesquisa de <i>Leptospira</i> no parênquima testicular (Técnica de Levaditi).....	22
3.12. Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	46
7. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Títulos de anticorpos antileptospira sorovar Canicola de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007.....	27
2. Títulos de anticorpos antileptospira sorovar Canicola de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.....	27
3. Títulos de anticorpos antileptospira sorovar Canicola de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007.....	28
4. Títulos de anticorpos antileptospira sorovar Canicola de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007.....	28
5. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento (0 a 5), da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007.....	29
6. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento (0 a 5), da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.....	30

7. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhamento (0 a 5), da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 31
8. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhamento (0 a 5), da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 32
9. Resultado da PCR para amostras de sêmen de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 33
10. Resultado da PCR para amostras de sêmen de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 33
11. Resultado da PCR para amostras de sêmen de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 34
12. Resultado da PCR para amostras de sêmen cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 34

13. Média aritmética, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) e erro padrão (EP) das concentrações plasmáticas de testosterona (ng/dL) de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 35
14. Média aritmética, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) e erro padrão (EP) das concentrações plasmáticas de testosterona (ng/dL) de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 35
15. Média aritmética, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) e erro padrão (EP) das concentrações plasmáticas de testosterona (ng/dL) de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 36
16. Média aritmética, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) e erro padrão (EP) das concentrações plasmáticas de testosterona (ng/dL) de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 36
17. Resultados obtidos na detecção do sorovar Canicola pela técnica de Levaditi no testículo de cães infectados e controles, após sete dias de infecção, de acordo com a titulação de anticorpos homólogos no dia da eutanásia, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 37
18. Resultados obtidos na detecção do sorovar Canicola pela técnica de Levaditi no testículo de cães infectados e controles, após 15 dias de infecção, de acordo com a titulação de anticorpos homólogos no dia da eutanásia, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 37
19. Resultados obtidos na detecção do sorovar Canicola pela técnica de Levaditi no testículo de cães infectados e controles, após 30 dias de infecção, de acordo com a titulação de anticorpos homólogos no dia da eutanásia, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 38

20. Resultados obtidos na detecção do sorovar Canicola pela técnica de Levaditi no testículo de cães infectados e controles, após 45 dias de infecção, de acordo com a titulação de anticorpos homólogos no dia da eutanásia, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 38

LISTA DE QUADROS

Página

1. Estirpes de *Leptospira interrogans* empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo o número de controle (código), o sorogrupo e o sorovar..... 15

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Resultado da PCR para amostra de sêmen do cão G1A2 (Grupo um animal infectado dois).....	39
2. Resultado da PCR para amostra de sêmen do cão G4A2 (Grupo quatro animal infectado dois).....	40
3. Limiar de detecção de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola por PCR, a partir do DNA obtido pela técnica de extração com isotiocianato de guanidina, de amostras de sêmen canino experimentalmente contaminado.....	41

**ALTERAÇÕES ESPERMÁTICAS E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE
TESTOSTERONA EM CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Leptospira*
interrogans sorovar Canicola**

RESUMO – Conhecendo-se a predileção das leptospiros pelo aparelho urogenital, e a crescente utilização de técnicas de reprodução assistida na espécie canina, o presente trabalho objetivou pesquisar a presença e a ação da *Leptospira* no sêmen e testículo de cães. Foram utilizados 32 animais, dos quais 20 foram inoculados com uma cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e 12 não receberam inóculo algum, sendo considerados animais-controle. Assim, os 32 animais experimentais foram reunidos em quatro grupos de estudo encerrando cinco cães inoculados e três cães-controle por grupo. Os animais do grupo um foram sacrificados após sete dias da inoculação, os animais do grupo dois sacrificados 15 dias após a inoculação, os animais do grupo três sacrificados após 30 dias de incubação e os animais do grupo quatro foram sacrificados após 45 dias da inoculação da cepa patogênica. Após o sacrifício, colheram-se fragmentos de testículo para pesquisa de *Leptospira* no parênquima testicular pela técnica de coloração de Levaditi. Nos dias zero (dia da inoculação), três, cinco, sete, dez, e a partir daí de cinco em cinco dias após a inoculação da cepa patogênica de *Leptospira*, foram colhidas amostras de sangue e sêmen. No sêmen, foram realizados exames andrológicos e PCR, no sangue, além da pesquisa de anticorpos pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), foram verificados os níveis hormonais de testosterona. Dos 20 cães infectados, apenas um não apresentou título detectável na prova de SAM no período analisado. No grupo dois, foi verificada uma queda significativa nos valores do vigor e da concentração espermática, nos cães infectados, durante grande parte do período de estudo. Já no grupo três, somente a concentração foi significativamente inferior nos animais infectados, em três dos nove dias de colheita de sêmen. Neste trabalho foi possível detectar DNA de leptospira no sêmen de dezesseis dos vinte cães inoculados com a cepa de *L. interrogans* sorovar Canicola. Entretanto não foi possível correlacionar a infecção por *L. interrogans* sorovar Canicola com a diminuição dos níveis sanguíneos de testosterona nos animais infectados, quando comparados àqueles dos cães

utilizados como controle. No presente estudo, não foi possível detectar leptospiras nos fragmentos de testículos de cães experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola.

Palavras-Chave: cães, *Leptospira*, PCR, sêmen, testosterona

**SPERMATIC AND PLASMATIC LEVELS CHANGES OF TESTOSTERONE IN DOGS
EXPERIMENTALLY INFECTED BY *Leptospira interrogans* serovar Canicola**

SUMMARY - Considering the *Leptospira* predilection for the urogenital system and the increasing of utilization of assisted reproduction in dogs, this work aimed to search the presence and the role of *Leptospira* in semen and testicles from dogs. From 32 animals, 20 were inoculated with a pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain and 12 received no inoculum, acting as control animals. The 32 experimental animals were distributed in four groups with five inoculated and three control dogs per group. Animals from group one were sacrificed seven days after inoculation, animals from group two were sacrificed 15 days after inoculation, animals from group three were sacrificed 30 days after inoculation, and animals from group four were sacrificed 45 days after inoculation. Testicle fragments were collected after dog sacrifices for searching *Leptospira* in testicle parenchyma using Levaditi stain technique. Blood and semen samples were collected at day zero (inoculation day), three, five, seven, ten and then by each five days after pathogenic *Leptospira* strain inoculation. Andrologic exams and PCR were performed with semen. Blood samples were used to detect antibodies using microscopic agglutination test (MAT) and verify testosterone levels. Only one of the 20 infected dogs had no detectable titre using MAT. Spermatic vigor and spermatic concentration had a significant decrease in group two during most part of the study. In three of nine days of semen collection, only spermatic concentrations were significantly lower in infected animals from group three. In this study it was possible to detect *Leptospira* DNA in semen samples from 16 of the 20 dogs inoculated with *L. interrogans* serovar Canicola strain. Thereby it was not possible to correlate the decrease of testosterone serum levels in infected animals with those detected in control animals. It was not possible to detect *Leptospira* in testicle fragments in the dogs experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola.

Keywords: dogs, Leptospira, PCR, semen, testosterone

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose é uma doença bacteriana infecto-contagiosa que acomete o homem e os animais domésticos e silvestres, amplamente disseminada, de considerável importância tanto no plano econômico quanto naquele da saúde pública (FAINE et al., 1999). A ocorrência da leptospirose é variável em diferentes partes do mundo, podendo-se observar tanto a forma esporádica quanto a endêmica. Os surtos se reproduzem por exposição à água contaminada com urina ou tecidos provenientes de animais infectados (VASCONCELLOS, 1993), particularmente nas ocasiões em que ocorrem elevados índices de precipitações pluviométricas, nas regiões em que o solo apresenta reação neutra ou levemente alcalina, associando-se ainda a uma grande variedade de espécies hospedeiras. Essas condições facilitam a cadeia de eventos necessários à transmissão da doença e à sobrevivência das leptospiras patogênicas no ambiente, ainda que essas não se multipliquem fora do organismo dos hospedeiros (FAINE et al., 1999).

A leptospirose apresenta forte significado sócio-econômico-cultural e é exacerbada por fatores como o crescimento desordenado de grandes centros urbanos, as migrações, as deficiências nas condições de saneamento básico e o acúmulo de lixo, que promovem ampla expansão de roedores (MAGALHÃES et al., 2006).

As leptospiras são espiroquetas pertencentes à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (NOGUCHI, 1918). O gênero *Leptospira* compreendia, anteriormente, duas espécies: *Leptospira interrogans*, apresentando grande variação antigênica caracterizada por 23 sorogrupos e 202 sorotipos (BARATON e POSTIC, 1989); e *Leptospira biflexa*, de comportamento saprófita e englobando variedades de vida livre presentes em água doce de superfície, distribuídas em 38 sorogrupos e 65 sorotipos (FAINE, 1994). Essa divisão baseava-se em critérios estritamente relacionados a reações sorológicas relativamente específicas, que forneciam os sorogrupos e sorovares de leptospiras patogênicas e saprófitas. A identificação dos sorotipos só era possível pelo emprego da técnica de absorção cruzada de aglutininas, realizada em laboratórios de referência (CENTRO

PANAMERICANO DE ZONOSIS, 1985). Em 1992, o Subcomitê de Taxonomia da *Leptospira* propôs uma nova divisão para o gênero *Leptospira*, que passou a ser constituído por oito genomoespécies patogênicas, assim denominadas: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans sensu stricto*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. inadai* e *L. fainii* (KMETY e DIKKEN, 1993), distribuídas em 26 sorogrupos (ELLIS et al., 1986) e 250 sorovares (PERRY et al., 2000); e três genomoespécies saprófitas ou de vida livre, designadas: *L. biflexa*, *L. meyeri* e *L. wolbachii*, estas com raros registros de infecções (KMETY e DIKKEN, 1993).

Os diferentes sorovares de *L. interrogans* não apresentam especificidade de hospedeiro, porém o que se observa é a existência de preferência de certos sorovares por determinados vertebrados. Exemplos dessa condição configuram-se nas associações estabelecidas entre o cão doméstico e o sorovar Canicola, o suíno e o sorovar Pomona, o bovino e os sorovares Wolffii e ou Hardjo, o eqüino e o sorovar Icterohaemorrhagiae (QUINN et al., 1994; FAINE, 1994).

A patogenia da leptospirose inclui a penetração do microrganismo através das mucosas ou de lesões na pele, seguida de multiplicação no sangue, e em praticamente todos os órgãos e tecidos, o que caracteriza a fase denominada leptospiremia, na qual há o comprometimento do fígado, dos rins, dos pulmões, das adrenais, do cérebro, do útero, do ovário, das trompas e da glândula mamária. Nas fêmeas em gestação, o abortamento e suas complicações tornam a leptospirose uma importante doença da esfera reprodutiva (FAINE, 1982; FAINE, 1994).

Durante o período de incubação, de sete a 14 dias, ocorre a septicemia, elicitando a produção de anticorpos da classe IgM, que têm atividade de poucos dias, e, mais tardiamente, surgimento de anticorpos da classe IgG. Apesar dos anticorpos auxiliarem no combate à bacteremia, não eliminam por si só a infecção renal (REBHUN, 1995). Nos animais que conseguem sobreviver à fase aguda da leptospirose, os microrganismos atingem a luz dos túbulos contornados renais e passam a ser eliminados por intermédio da urina por períodos de tempo variados, caracterizando a fase de leptospirúria; com isso, os animais tornam-se uma fonte de infecção importante, então denominados portadores renais (VASCONCELLOS, 1987).

A transmissão da *Leptospira* spp. pode ocorrer de forma indireta, pelo contato

com água e solos contaminados, e pelo modo direto, principalmente pela via venérea (AMATREDJO et al., 1975). A transmissão transplacentária também é comum entre os animais (BRASIL, 1995). Uma vez infectados, os animais podem eliminar o agente na urina por um período de tempo variável, que pode chegar a mais de um ano (HANSON, 1992; THIERMANN, 1984). Segundo REBHUN (1995), a leptospiúria em bovinos pode persistir entre dez dias e quatro meses, tendo caráter intermitente.

Vale lembrar que, originalmente, os carnívoros silvestres não representam uma fonte de infecção muito séria para o homem, uma vez que, devido a sua alimentação à base de carnes, a urina apresenta-se mais ácida, sabidamente um ambiente inóspito para as leptospiras. Entretanto, no caso dos cães domésticos, alimentados com rações comerciais, o pH da urina torna-se mais apropriado à manutenção e sobrevivência das referidas bactérias. Em cães, a leptospirose está habitualmente relacionada com nefrite intersticial e, como consequência dos danos renais, proteinúria (ZARAGOZA et al., 2003).

Assim, em ambiente urbano, a principal fonte de infecção da leptospirose humana são os cães. Estes animais vivem em contato direto com os seres humanos e podem eliminar leptospiras vivas pela urina durante meses, mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico (FAINE et al., 1999). Além do mais, nessa espécie animal, a leptospirose pode ser causada por vários sorovares patogênicos, levando a uma enfermidade com elevada letalidade (BIRNBAUM et al., 1998; PERRET et al., 2005). Ademais, os roedores são um importante reservatório da doença e fonte de infecção para os cães, o que torna difícil a erradicação da leptospirose na população canina (DUTTA e CHRISTOPHER, 2005; PERRET et al., 2005).

Um estudo realizado no Hospital Escola da Faculdade de Veterinária de Ontário (Canadá) mostrou um aumento acentuado no número de casos de leptospirose canina a partir do ano de 1998 (PRESCOTT et al., 2002).

Vários inquéritos sorológicos realizados em cães no Brasil retratam a variabilidade da distribuição de sorovares de *Leptospira* spp. predominantes nas diferentes localidades. Na cidade de Pelotas, RS, FURTADO et al. (1997) examinaram 260 cães e encontraram prevalência de 28,9%, com destaque para os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae; ÁVILA et al. (1998) encontraram 34,8%

de animais soropositivos em 425 cães examinados, com predomínio dos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, e JOUGLARD e BROD (2000) verificaram 2,7% de positividade em 489 cães, com destaque para os sorovares Icterohaemorrhagiae, Australis, Copenhageni, Pyrogenes, Sentot e Canicola. Em Santana de Parnaíba, SP, MASCOLLI et al. (2002) examinaram 410 amostras de soro de cães e encontraram 15% de positividade, com destaque para os sorovares Copenhageni, Canicola e Hardjo. BATISTA et al. (2005) examinaram 285 amostras de soro sanguíneo de cães colhidas durante a campanha de vacinação anti-rábica animal, em Campina Grande, PB, e encontraram prevalência de leptospirose de 21,4%, com maior frequência dos sorovares Autumnalis, Copenhageni e Canicola. MAGALHÃES et al. (2006) colheram amostras de sangue de 3.417 cães, em Belo Horizonte, MG, no período de setembro de 2001 a setembro de 2002, e encontraram 13,1% de soropositividade, sendo os sorovares Canicola, Ballum, Pyrogenes e Icterohaemorrhagiae os mais prevalentes.

A leptospirose tem como principal mecanismo de transmissão a exposição a água ou solo contaminado, no entanto a transmissão venérea, em bovinos, já foi amplamente confirmada tanto na monta natural como na inseminação artificial (ROBERTS, 1958; SLEIGHT e WILLIAMS, 1961).

A presença de *Leptospira* spp. em sêmen de touros, natural e experimentalmente infectados, já foi demonstrada, indicando a possibilidade de transmissão da leptospirose bovina pela monta natural ou pela inseminação artificial (IA) (SLEIGHT e WILLIAMS, 1961; SLEIGHT et al., 1964; SLEIGHT, 1965; RODINA, 1971; RODINA e BALASHOV, 1971).

SLEIGHT e WILLIAMS (1961) concluíram que a confluência anatômica dos aparelhos urinário e genital dos machos, cuja uretra é o ducto excretor comum para urina e sêmen, favorece a contaminação do sêmen por leptospiros na fase de leptospiúria.

Uma das primeiras comprovações da importância do sêmen como meio de transmissão da leptospirose foi verificada por KIKTENKO et al. (1976), que isolaram leptospiros de quatro amostras de sêmen de um total de 56 touros examinados. Em tal estudo, foi verificado que alguns animais infectados apresentaram inibição dos reflexos sexuais e perda na qualidade do sêmen, com queda na concentração e na

motilidade, diminuição do volume do ejaculado e necrospemia. Além disso, a necropsia de três machos revelou a presença de inflamação dos testículos e das glândulas anexas.

Esta importante zoonose de distribuição mundial (ACHA e SZYFRES, 1986) não provoca sinais patognomônicos, e, portanto, seu diagnóstico clínico é difícil, exigindo usualmente a confirmação laboratorial (STOENNER, 1972), que se baseia no isolamento das leptospiros ou na presença de anticorpos específicos elicitados pelo agente (VASCONCELLOS, 2000).

A prova de soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste sorológico mais utilizado para o diagnóstico da leptospirose (BOLIN et al., 1989), no Brasil e em todo o mundo (OLIVEIRA, 1999). THIERMANN (1984) ressalta que, apesar da padronização desse teste, há dificuldade em obter resultados concordantes entre os diferentes laboratórios, uma vez que se trata de uma prova com resultados subjetivos. É uma técnica laboriosa e exige o uso de leptospiros vivos como antígenos (CHAPPEL et al., 1998).

O diagnóstico definitivo da infecção por *Leptospira* spp. é usualmente firmado pelo isolamento e cultivo do agente, entretanto esse procedimento é oneroso, necessita de amostras recém-colhidas e, pelo menos, 30 dias até três meses são requeridos para a obtenção de resultados conclusivos (BOLIN et al., 1989).

A partir da descoberta da técnica de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase – *Polymerase Chain Reaction*), em meados da década de 1980, houve uma verdadeira revolução na biologia, principalmente no que concerne às áreas aplicadas envolvendo diagnóstico e melhoramento genético em plantas e animais domésticos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Desde então, muitos trabalhos têm descrito a aplicação de técnicas baseadas em PCR para diversos fins em cinofilia, inclusive seleção genética, identificação de parentesco e prevenção de doenças genéticas.

MÉRIEN et al. (1992) sintetizaram o par de oligonucleotídeos iniciadores (primers) Lep 1 e Lep 2 a partir da seqüência do gene 16S rRNA de *L. interrogans* sorovar Canicola determinada por FUKUNAGA et al. (1990). A técnica de PCR, quando utilizada com esse par de oligonucleotídeos iniciadores, revela-se específica para *Leptospira* spp., não amplificando o DNA de outras bactérias como *Borrelia*

burgdorferi, *Borrelia hermsii*, *Treponema denticola*, *Treponema pallidum*, entre outras.

Mais recentemente, novos primers têm sido desenvolvidos a partir de DNA de outros sorovares, como Icterohamorrhagiae e Bim, estes capazes de detectar apenas leptospiros patogênicas (GRAVEKAMP et al., 1993).

HEINEMANN (1995) demonstrou que os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados por MÉRIEN et al. (1992) são capazes de amplificar um fragmento de 330 pares de base (bp) a partir do DNA de todos os 30 sorovares de *Leptospira* spp., testados em seu trabalho, independentemente de serem das espécies apatógênicas ou patogênicas, devido, provavelmente, ao fato dos genes de rRNA serem altamente conservados entre as bactérias.

A técnica de PCR vem sendo utilizada com sucesso em vários estudos relacionados com leptospirose, seja para simples detecção do agente em diversos materiais, como sêmen (HEINEMANN, 1995; MASRI et al., 1997; HEINEMANN et al., 2000), urina (VAN EYS et al., 1989; MASRI et al., 1997; CETINKAYA et al., 2000) e humor aquoso (FABER et al., 2000), seja para monitorar a densidade de leptospiros em sangue e órgãos de hamsters infectados experimentalmente e tratados com diferentes doses de antibióticos (TRUCCOLO et al., 2002).

Nos últimos anos, a técnica de PCR tornou-se uma importante ferramenta na detecção de agentes patogênicos. O método é rápido e extremamente sensível, podendo teoricamente detectar uma única molécula de DNA em poucas horas. Outra grande vantagem da técnica de PCR decorre do fato de não ser necessária a viabilidade dos patógenos para a realização do teste, o que permite a inativação e o armazenamento das amostras, bem como a aplicação da técnica em amostras mal conservadas (GILLESPIE, 1990; GINGERAS et al., 1990; PAUL, 1990). KEE et al. (1994) puderam detectar *L. interrogans* no sangue de sagüi (*Merionis unguiculatus*) dois dias após a infecção experimental, enquanto anticorpos só foram detectados pela SAM sete dias pós-infecção.

CAI et al. (2002) utilizaram os primers G1/G2 e B64-I/B64-II para detectar sorovares de leptospiros patogênicas em urina canina. Relataram que a prova se mostrou específica e sensível, apresentando um limiar de detecção, para o sorovar Icterohaemorrhagiae, de 100 células de leptospira por mililitro de urina.

Em um estudo com 123 cães que apresentavam sintomas sugestivos de leptospirose e 13 animais clinicamente sadios, concluiu-se que a PCR teve 100% de sensibilidade e 88,3% de especificidade, para detecção de leptospira na urina de cães, sendo considerada uma importante ferramenta no diagnóstico precoce de leptospirose (HARKIN et al., 2003a). No mesmo ano, HARKIN et al., 2003b, publicaram outro trabalho comparando PCR, cultura bacteriológica e teste sorológico na detecção de leptospirúria e afirmaram que, independentemente do estado de saúde, 8,2% dos cães eliminavam leptospiras patogênicas na urina, representando um risco para seus proprietários. Concluíram, também, que a SAM é um indicativo fraco, em termos de diagnóstico precoce, para certificar a eliminação de leptospiras pela urina.

Vários autores têm descrito bons limiares de detecção de leptospiras pela técnica de PCR. HEINEMANN (1995) descreveu ter detectado 10 bactérias por mL em sêmen de touros; no entanto, mudando a técnica de extração de DNA, HEINEMANN et al. (2000) observaram um limiar de detecção de 100 bactérias por mL para o mesmo material. Em urina, CETINKAYA et al. (2000) detectaram até cinco leptospiras por mL do material. KIM et al. (2006), em contaminação experimental de sêmen canino com *Leptospira interrogans*, conseguiram um limiar de detecção de 1.000 bactérias por mL de sêmen com a técnica de PCR. No mesmo trabalho, os autores aplicaram Nested PCR ao mesmo material, na qual atingiram um limiar de 100 bactérias por mL de sêmen. VELOSO et al. (2000) atentaram para o fato de que o procedimento de extração do DNA do material que se deseja avaliar e os primers utilizados podem propiciar diferentes resultados.

MAGAJEVSKI et al. (2005), estudando amostras pareadas de sêmen e de urina de 10 touros naturalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, detectaram DNA de leptospira em apenas uma amostra de urina e em nenhuma das amostras de sêmen. No entanto amostras de urina de cinco touros foram positivas no isolamento em meio de cultivo, alertando para o fato de que diferentes técnicas de extração de DNA e os “primers” utilizados podem fornecer diferentes resultados.

Apesar do crescente interesse pela reprodução dos cães, existem poucas informações científicas sobre a fisiologia da reprodução da espécie canina, em

comparação com outras espécies animais. Além disso, poucas das múltiplas causas de infertilidade em cães machos têm sido caracterizadas (FRESHMAN et al., 1988), requerendo assim estudos mais aprofundados sobre a função espermática.

O aumento no número e na variedade de parâmetros anormais do sêmen reflete condições de subfertilidade, indicando a necessidade de investigação mais profunda. A análise do sêmen inclui avaliação de coloração, volume, motilidade, vigor, concentração, defeitos e avaliação citológica (ROOT e JOHNSTON, 1994).

A coloração normal para o sêmen de cães é branca-opalescente (JOHNSTON, 1991). O aspecto do sêmen varia conforme a concentração de espermatozóides e a quantidade de líquido prostático presente no ejaculado (ROOT e JOHNSTON, 1994). O ejaculado dos cães é dividido em três distintas frações. O volume do sêmen dos cães apresenta variações desde 1 mL até mais de 80 mL na somatória das três frações. O volume também é dependente da quantidade de líquido prostático (ROOT e JOHNSTON, 1994). A motilidade do sêmen deve ser superior a 70% (JOHNSTON et al., 2001a). O vigor corresponde à graduação de velocidade na qual o espermatozóide se move (ROOT e JOHNSTON, 1994).

A concentração espermática é muito variável entre cães, normalmente cães maiores produzem mais espermatozóides do que os menores (ROOT e JOHNSTON, 1994).

Mamíferos com boa fertilidade normalmente possuem alta porcentagem de espermatozóides normais e uniformes (OMBELET et al., 1995). Anormalidades do sêmen associadas com infertilidade incluem oligospermia ou azoospermia, volume abaixo do normal, baixa motilidade, presença de hemospermia ou leucospermia e grande quantidade de patologias espermáticas.

São parâmetros normais para o sêmen de cães: motilidade espermática acima de 70%, concentração acima de 200 milhões de espermatozóides por ejaculado e mais de 80% de espermatozóides morfologicamente normais (MEYERS-WALLEN, 1991). A coexistência de motilidade insuficiente e morfologia espermática anormal afigura-se, freqüentemente, como o primeiro indicador de lesão gonadal, independentemente da causa (JOHNSON, 1994). As etiologias incluem afecção testicular primária, distúrbios endócrinos, agressões pelo meio ambiente, ejaculação incompleta e causas iatrogênicas (JOHNSON, 1994).

A fisiologia da reprodução nos cães machos é similar à de outras espécies, em que o controle da atividade testicular dá-se principalmente por intermédio dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). O hormônio luteinizante (LH) estimula as células de Leydig, que produzem testosterona (JOHNSON, 1994), cujas funções incluem a promoção do desenvolvimento do ducto deferente e do epidídimo, para iniciar e manter todas as etapas da espermatogênese; a manutenção da libido e a regulação da secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo e de gonadotrofinas (LH e FSH) pela hipófise (JOHNSON, 1994). Portanto, a testosterona é essencial a todas as fases da espermatogênese.

Doenças inflamatórias crônicas e infecções agudas são capazes de inibir a esteroidogênese gonadal. Estudos têm demonstrado que a ativação da imunidade em resposta aos lipopolissacarídeos de membrana presentes nas bactérias (LPS) resulta em redução dos níveis séricos de testosterona, por efeito direto nas células de Leydig, possivelmente porque os macrófagos testiculares produzem espécies reativas de oxigênio (EROS), que causam danos à membrana mitocondrial das células de Leydig e conseqüente inibição da esteroidogênese (ALLEN et al., 2004).

DHALIWAL et al. (1997) infectaram experimentalmente oito vacas com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, acompanhando as concentrações plasmáticas de progesterona desses animais durante a prenhez. Os autores observaram diminuição significativa nos níveis plasmáticos de progesterona nas fêmeas bovinas infectadas quando comparados aos do grupo-controle.

Em seres humanos, ABDULKADER et al. (1996) compararam os níveis hormonais de cortisol e aldosterona de nove pacientes com leptospirose e oito indivíduos saudáveis e relataram que os níveis sanguíneos dos referidos hormônios foram mais elevados nos pacientes com leptospirose.

Além dos métodos habitualmente utilizados no diagnóstico da leptospirose, como a técnica de SAM, a leptospirose pode ser diagnosticada pela visualização do agente em fragmentos de tecidos (ELLIS et al., 1983) por várias técnicas, tais como imunofluorescência, imunoperoxidase, colorações com sais de prata e técnica de Levaditi.

Utilizando a técnica de Levaditi, KANEKO e OKUDA (1917) conseguiram

demonstrar a presença de leptospiras em mais de 50% dos tecidos hepáticos de 43 casos clínicos de leptospirose humana. Nos fragmentos de rins examinados, verificou-se a presença do agente; nos primeiros dias, as leptospiras estavam localizadas no interstício e, mais tardiamente, no espaço intracelular.

ZAMORA (1995) encontrou, por intermédio da técnica de Levaditi, assim como por observação direta em campo escuro, imunofluorescência e imunistoquímica, a presença de leptospira em rins de 43% dos roedores silvestres examinados. A técnica que apresentou o melhor desempenho foi a de Levaditi, em 67,5% dos rins.

CAMARGO et al. (1993) verificaram a presença de *L. interrogans* sorovar Pomona pela reação de imunofluorescência direta e pela técnica de Levaditi em fragmentos de ovários de hamsters experimentalmente infectados. As leptospiras foram localizadas em diferentes estruturas dos ovários, como no interstício, nos vasos sangüíneos e linfáticos, na altura da zona pelúcida e no interior dos óvulos.

Um autor do mesmo grupo, acima referido, CAMARGO (1996), verificou a presença do sorovar Pomona, a partir da coloração de Levaditi, em ovários de hamsters infectados experimentalmente, que foram induzidos à condição de portadores renais pela administração do estolato de eritromicina.

BRANDESPIM et al. (2003) usaram as técnicas de Levaditi e imunistoquímica e observaram a presença de *L. interrogans* sorovar Pomona no testículo, no epidídimo e na vesícula seminal de hamsters experimentalmente infectados.

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm se dedicado a estudar a presença das leptospiras nos tecidos, com o objetivo de detectar a possível localização desse microrganismo em estruturas do aparelho reprodutor, tanto nas fêmeas quanto nos machos. Tal preocupação tem como pano de fundo a necessidade de uma melhor compreensão da patogenia da leptospirose, que certamente poderá ensejar o desenvolvimento de métodos mais eficientes no controle sanitário e epidemiológico desta importante entidade nosológica (MARPLETOFT, 1986).

2- OBJETIVOS

Considerando-se a escassez de informações bibliográficas referentes ao comprometimento do aparelho reprodutor de cães infectados por leptospira, assim como a crescente utilização de técnicas de reprodução assistida na espécie canina, idealizou-se o presente ensaio com os objetivos que se seguem:

1. Verificar se há variação do padrão hormonal de testosterona em cães infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola;
2. Pesquisar a presença de leptospiros em sêmen de cães experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola pela técnica de PCR;
3. Avaliar o perfil andrológico desses animais comparando-o ao de animais não infectados;
4. Pesquisar, por intermédio da técnica de Levaditi, a presença de leptospiros nos testículos de cães experimentalmente infectados;
5. Determinar o limiar de detecção da PCR em sêmen canino experimentalmente contaminado, utilizando-se a técnica de extração de DNA com isotiocianato de guanidina.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Origem e seleção dos animais

O ensaio em tela incluiu cães machos, em idade reprodutiva, recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses do Município de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, que não apresentaram título de anticorpos séricos contra os sorovares de *Leptospira* spp. apresentados no Quadro 1, por meio da prova de soroaglutinação microscópica (SAM), em dois testes realizados no intervalo de sete dias, e cuja cultura de urina em meio semi-sólido de Fletcher (Difco) mostrou-se negativa em ambos os testes, descartando a possibilidade dos animais serem portadores renais (FAINE, 1982).

3.2 – Instalação e manejo dos animais experimentais

Os cães previamente selecionados foram mantidos em baias individuais apropriadas no Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” do Centro Universitário de Rio Preto - Unirp, com temperatura ambiental não climatizada, recebendo água comum da rede pública e ração comercial “ad libidum”.

3.3 – Constituição dos grupos experimentais

Foram utilizados 32 animais dos quais 20 foram inoculados com uma cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e 12 não receberam inóculo algum, sendo considerados animais-controle. Assim, os 32 animais experimentais foram reunidos em quatro grupos de estudo encerrando cinco cães inoculados e três cães-controle por grupo. Os animais do grupo um (G1) foram sacrificados após sete dias da inoculação, os animais do grupo dois (G2) sacrificados 15 dias após a inoculação, os animais do grupo três (G3) sacrificados após 30 dias de incubação e os animais do grupo quatro (G4) foram sacrificados após 45 dias da inoculação da cepa patogênica.

3.4 – Inoculação

Foi utilizado um inóculo com uma cepa virulenta do sorovar Canicola (cepa LO4*) na concentração de 10^9 leptospiras por mL. Para se obter tal concentração, as leptospiras foram contadas em lâminas microscópicas 24 x 76 mm, (FAINE, 1982). Foram aplicados três mililitros do inóculo por via subcutânea na região cervical-dorsal.

3.5 – Colheita das amostras

Nos dias zero (dia da inoculação), três, cinco, sete, dez, e a partir daí de cinco em cinco dias após a inoculação da cepa patogênica de *Leptospira*, foram colhidas amostras de sangue e sêmen. No sêmen foram realizados exames andrológicos e PCR, no sangue, além da pesquisa de anticorpos pela técnica de SAM (estabelecendo-se uma curva de títulos), foram verificados os níveis hormonais de testosterona.

3.5.1 – Sangue

As colheitas de sangue foram realizadas por venipunção jugular nos animais de menor porte e cefálica nos animais de porte racial maior. Parte do sangue foi utilizada para obtenção do plasma e parte dessorada após retração do coágulo. O soro foi então identificado e encaminhado para o exame sorológico, que foi realizado pela técnica de SAM. A referida prova serviu como indicadora dos animais que fizeram parte da pesquisa, a partir do resultado positivo ou negativo na mesma, e em seguida para estabelecer a curva de títulos dos animais. As amostras de sangue para realização das dosagens hormonais foram obtidas sempre no período da manhã (entre 8:30 e 11:30 horas), na mesma seqüência e imediatamente após a colheita de sêmen. Para obtenção do plasma, o sangue total era acondicionado em tubos do tipo vacutainer contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como

* Isolada pelo Prof. Dr. Júlio de Freitas – UEL, gentilmente cedida pela Dr^a. Margareth Élide Genovez do Instituto Biológico de São Paulo

anticoagulante (10mg/mL de sangue). Após a colheita, as amostras eram centrifugadas a 1.500g por 10 minutos, e o plasma sangüíneo aliqüotado, acondicionado em frascos plásticos de 1,5 mL e congelado à temperatura de -20°C até o momento das análises.

3.5.2 – Sêmen

As amostras de sêmen foram obtidas aplicando-se a técnica de estimulação manual peniana (JOHNSTON et al., 2001b). Após o envase em microtubos de 1,5 mL, as referidas amostras eram congeladas à temperatura de -20°C até o momento da realização da PCR.

3.6 – Pesquisa de anticorpos

3.6.1 – Preparo dos antígenos de leptospira

Os sorovares de leptospira utilizados como antígenos foram provenientes de matrizes repicadas semanalmente em meio de cultura EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris, Difco) enriquecido com soro sangüíneo de coelho, na proporção de 10%, e mantidos em estufa bacteriológica (B.O.D.) à temperatura de 28°C. Todos os antígenos foram utilizados ao redor do sexto dia de incubação. A concentração considerada ideal foi padronizada de forma a corresponder à metade da turvação do tubo número 1 da escala de MacFarland (100 a 200 leptospiras por campo microscópico), livre de contaminação e de auto-aglutinação, segundo as orientações de SULZER & JONES (1980).

3.6.2 – Técnica de soroaglutinação microscópica

Os soros foram diluídos em solução tamponada de Sørensen, segundo SANTA ROSA (1970), sendo a diluição inicial de 1/5. Dessa diluição foram pipetadas alíquotas de 50 µL e depositadas em poços de placa de 96 cavidades, nos quais foram colocadas idênticas quantidades de antígeno, resultando numa diluição de 1/10. A mistura soro-antígeno foi levemente agitada e incubada em estufa

bacteriológica à temperatura de 28°C por duas horas, procedendo-se a seguir à leitura em microscopia de campo escuro, com objetiva de 40x e ocular de 15x. O critério adotado para considerar um soro como reagente foi o de 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospiras aglutinadas sob o campo microscópico no aumento de 100 vezes. Os soros reagentes na triagem inicial foram reexaminados com diluições seriadas de razão dois. O título do soro foi considerado a recíproca da sua maior diluição que apresentou 50% de aglutinação.

Quadro 1. Estirpes de *Leptospira interrogans* empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo o número de controle (código), o sorogrupo e o sorovar.

Código	Sorogrupo	Sorovar
1-A	<i>Australis</i>	Australis
1-B	<i>Australis</i>	Bratislava
2-A	<i>Autumnalis</i>	Autumnalis
2-B	<i>Autumnalis</i>	Butembo
2-C	<i>Ballum</i>	Castellonis
3	<i>Bataviae</i>	Bataviae
5	<i>Canicola</i>	Canicola
6	<i>Celledoni</i>	Whitcombi
7	<i>Cynopteri</i>	Cynopteri
8	<i>Grippotyphosa</i>	Grippotyphosa
9	<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis
10-A	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Copenhageni
10-B	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Icterohaemorrhagiae
11	<i>Javanica</i>	Javanica
12	<i>Panamá</i>	Panamá
13	<i>Pomona</i>	Pomona
14	<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes
15-A	<i>Sejroe</i>	Hardjo
15-B	<i>Sejroe</i>	Wolffi
16	<i>Shermani</i>	Shermani
17	<i>Tarassovi</i>	Tarassovi
18	<i>Andamana</i>	Andamana
20	<i>Seramanga</i>	Patoc
ST	<i>Djasiman</i>	Sentot

3.7 – Dosagens hormonais

As concentrações plasmáticas de testosterona foram determinadas por radioimunoensaio (RIA) em fase sólida utilizando “kits” comerciais (Coat-A-Count Total Testosterone, DPC®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA).

Resumidamente, o radioimunoensaio em fase sólida é baseado em anticorpos específicos contra a testosterona, imobilizados nas paredes dos tubos de polipropileno.

A testosterona marcada com ^{125}I compete por um período fixo de tempo com a testosterona da amostra pelos sítios dos anticorpos. Para a realização do teste foram adicionados 50,0 μL da amostra em 1,0 mL de testosterona total conjugada ao ^{125}I , que após homogeneização foi incubada por 30 minutos à temperatura de 37°C. Em seguida, o material foi decantado, para separar a forma ligada da livre.

Posteriormente, os tubos foram levados a um contador gamma para a determinação da radiação, que é proporcional à quantidade de antígeno ^{125}I ligado ao anticorpo.

A quantidade de testosterona presente na amostra foi determinada a partir de uma curva de calibração que acompanha o “kit” comercial. As análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Dosagens Hormonais no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), em duplicata, e a concentração de testosterona expressa em ng/dL.

3.8 – Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)*

3.8.1 – Extração de DNA

A extração de DNA das amostras clínicas (sêmen) foi realizada com o reagente isotiocianato de guanidina, adaptado de CHOMCZYNSKI (1993). Essa reação foi realizada em microtubos de 1.500 μL , de acordo com a seqüência de

* Realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia Aplicada da FMVZ/USP sob supervisão do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

etapas que se seguem:

- Adição de 600 μL de isotiocianato de guanidina.
- Adição de 200 μL de sêmen.
- Homogeneização por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- Incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugação rápida.
- Adição de 100 μL de clorofórmio gelado.
- Homogeneização por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- Incubação durante 3 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugação a 14.000 x g/5min.
- Transferência de 400 μL da fase aquosa para novo tubo de 1.500 μL , tomando-se cuidado de não aspirar a interface orgânica.
- Realização da precipitação acrescentando 600 μL de propanol gelado, homogeneizar por inversão.
- Estocagem da amostra por, no mínimo, 2 horas a -20°C .
- Centrifugação a 14.000 x g/20min.
- Desprezo do sobrenadante por inversão.
- Adição de 500 μL de etanol a 70%.
- Centrifugação a 14.000 x g/15min.
- Desprezo do sobrenadante por inversão.
- Banho Maria a 56°C por 15 minutos.
- Suspensão do sedimento com 30 μL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0).
- Banho Maria a 56°C por 30 minutos.
- Estocagem à temperatura de -20°C , ou utilização imediata para amplificação.

3.8.2 – Oligonucleotídeos iniciadores (primers) empregados na amplificação

Foram utilizados os primers descritos por MÉRIEM et al. (1992), gênero-

específicos de 330 pb

PRIMERS	SEQÜÊNCIA
Lep 1	5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3'
Lep 2	3' TTAGAACGAGTTACCCCCCTT 5'

3.8.3 – Amplificação do DNA bacteriano

A amplificação das amostras de DNA foi realizada em microtubos de 500 μL , com volume final de 25 μL , de acordo com o protocolo de MERIEM et al. (1992), descrito a seguir:

- Adição de 16,1 μL de água ultrapura.
- Adição de 2,5 μL de tampão de reação 10x (500mMKCl; 15mM MgCl₂; 100mM tris-HCl, pH 9,0).
- Adição de 0,5 μL da mistura de dNTPs (200 μM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]).
- Adição de 0,75 μL de MgCl₂ (50 mM).
- Adição de 1,25 μL de Lep 1 (10 pmol/ μL).
- Adição de 1,25 μL de Lep 2 (10 pmol/ μL).
- Adição de 0,15 μL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades por μL).
- Adição de 2,5 μL da amostra de DNA extraído.

3.8.4 – Ciclo de amplificação

Foi utilizado o ciclo preconizado por RICHTZENHAIN et al. (2002). Inicialmente foi realizada a desnaturação da fita, utilizando a temperatura de 94°C por 5 minutos. Foram empregados 40 ciclos, divididos como descrito abaixo:

- Desnaturação do DNA: 94°C/30seg
- Anelamento dos “primers”: 60°C/30seg
- Polimerização do DNA: 72°C/30seg

- Extensão final: 72°C/5min

3.8.5 – Análise do produto amplificado

A visualização do produto amplificado (330 pares de base) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), utilizando-se tampão de corrida TBE 0,5X (0,04M tris-acetato e 0,001M EDTA, pH 8,0), segundo SAMBROOK et al. (1989).

A cada uma das cavidades do gel foram adicionados 12 µL de uma mistura contendo 10 µL de produto amplificado e 2 µL de corante (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%). O gel foi submetido a uma voltagem constante de 6-7 V por centímetro de distância entre os eletrodos em cuba horizontal, contendo tampão de corrida TBE 0,5%.

A revelação das bandas foi realizada por meio da imersão do gel em uma solução de brometo de etídio a 5 µg por mL durante 15 minutos e posterior observação em transluminador ultravioleta. O gel foi fotografado pelo sistema EDAS* (Electrophoresis Documentation and Analysis System - KODAK).

Como controle positivo foi utilizada uma cultura com o sorovar Canicola, e como controle negativo foi utilizada água.

3.8.6 – Amostra de sêmen canino para contaminação experimental

A amostra de sêmen canino submetida à contaminação experimental com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola foi obtida a partir de um animal utilizado como controle negativo do experimento, que não apresentou título de anticorpos séricos contra os sorovares de *Leptospira* spp. incluídos no Quadro 1, por meio da prova de SAM (FAINE, 1982), e negativo para a técnica de PCR utilizada.

3.8.7 – Determinação do limiar de detecção da técnica de PCR na amostra de sêmen canino experimentalmente contaminado com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola

A fim de avaliar a menor concentração de DNA bacteriano que a técnica de PCR pôde detectar em sêmen canino, utilizando-se a técnica de extração de DNA com isotiocianato de guanidina, o sêmen descrito no item 3.8.6 foi contaminado experimentalmente com diferentes concentrações de uma suspensão bacteriana. Para tanto, as bactérias foram diluídas diretamente na amostra de sêmen, de maneira a obter as seguintes concentrações de bactérias/mL: $3,6 \times 10^7$, 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 .

A suspensão bacteriana empregada, foi uma cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, gentilmente cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP. Por meio da metodologia de contagem em campo escuro descrita por FAINE (1982), essa suspensão bacteriana revelou conter $3,6 \times 10^8$ bactérias/mL.

3.9 – Análise dos ejaculados*

Imediatamente após a colheita, o ejaculado foi mantido em temperatura ambiente, sendo analisado macro e microscopicamente.

3.9.1. Análises macroscópicas

3.9.1.1. Volume

O volume do ejaculado foi medido no próprio tubo graduado no qual foi feita a coleta.

3.9.1.2. Coloração

A coloração foi verificada pela simples inspeção visual, sendo considerada normal para o ejaculado do cão, a cor branco-opalescente a branco-leitosa (ROOT e JOHNSTON, 1994).

3.9.2. Análises microscópicas

* Realizado no momento da colheita no Laboratório de Reprodução da Unirp

3.9.2.1. Motilidade espermática

Uma gota de sêmen fresco foi colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecida a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase, com aumento de 10X, sendo a avaliação registrada sob a forma de porcentagem de células em movimento progressivo.

3.9.2.2. Vigor

Usando as mesmas preparações microscópicas empregadas para a avaliação da motilidade, avaliou-se a qualidade do movimento progressivo dos espermatozóides, considerando-se escores de zero (nenhum movimento) a cinco (movimento retilíneo).

3.9.2.3. Concentração espermática

Para determinação da concentração de espermatozóides (sptz/mL) foi utilizada diluição de 1/20, sendo 50 μ L do ejaculado em 950 μ L de água destilada. A partir da referida diluição, preencheram-se as duas hemicâmaras de "Neubauer". Decorridos dois minutos, para sedimentação das células espermáticas, as contagens foram realizadas em microscópio de contraste de fase, com aumento de 40X, e o número de células contadas expresso em espermatozóides por mL.

3.9.2.4. Turbilhonamento

O turbilhonamento traduz o movimento de massa dos espermatozóides. Foi colocada uma gota de sêmen sobre uma lâmina aquecida a 37°C. A seguir a referida lâmina foi levada ao microscópio sobre uma placa aquecida, observada com auxílio de uma objetiva de 100x, e o movimento foi classificado segundo uma escala de zero a cinco.

3.10 – Eutanásia

Os animais foram inicialmente sedados com acepromazina na dose de 0,01 mg/kg via intravenosa e em seguida tratados, pela mesma via, com overdose de tionembutal (25 mg/kg) e brometo de pancurônio na dose de 0,11 mg/kg I.V. até total parada cardiorrespiratória. Após a eutanásia, colheram-se fragmentos de testículo para realização da técnica de coloração de Levaditi. Os fragmentos eram acondicionados em frascos plásticos apropriados, que continham uma suspensão de formalina a 10%, e armazenados para os procedimentos histotécnicos ulteriores.

3.11 – Pesquisa de *Leptospira* no parênquima testicular (Técnica de Levaditi)

A técnica de Levaditi foi conduzida junto ao Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, conforme procedimento descrito por McMANUS & MOWRY (1965), como segue:

- Os fragmentos de tecidos foram cortados na espessura de 1 a 2 mm e fixados em formol 10% por 24 horas à temperatura ambiente.
- Lavagem em água corrente por 1 hora.
- Lavagem em álcool 96° por 24 horas.
- Lavagem em álcool 70° por 24 horas.
- Retirada do álcool e imersão em água.
- Revelação em solução de nitrato de prata (Nuclear 2850), por 72 horas à temperatura de 37°C, no escuro.
- Bloqueio da reação em solução redutora, por 24 a 72 horas à temperatura de 37°C, no escuro.
- Lavagem em água destilada.
- Desidratação em série de álcoois em concentrações crescentes (70%, 95%, absolutos I, II e III) e em xilol.
- Diafanização, impregnação com parafina e inclusão em parafina.
- Cortes em micrómetro (4 a 5 µm) e montagem em resina sintética “PERMOUNT”.
- A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz óptica (Carl

Zeiss) com ocular 10X e objetivas 40X e 100X (imersão), com condensador de campo claro.

3.12 – Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa computacional Statistical Analysis System (SAS User's Guide: Statistics, 1985). Foram realizadas análises de variância individuais para cada parâmetro estudado, dentro de um delineamento inteiramente casualizado. Para as variáveis cujas médias foram consideradas significativas foi aplicado o teste t de Student para detectar diferenças entre os tratamentos em cada dia. Neste caso, considerou-se o nível de significância de 5% para todas as condições.

4 – RESULTADOS

Como pode ser verificado, nenhum animal do grupo-controle apresentou aglutinação frente à reação de soroprecipitação microscópica (SAM) aos 24 sorovares de *Leptospira* spp. utilizados (Quadro 1), a partir da diluição 1/10; e os demais animais só apresentaram reação ao sorovar Canicola.

Na Tabela 1 estão consignados os títulos de anticorpos antileptospira dos cães que constituíram o grupo um (G1) do experimento e que permaneceram infectados durante sete dias. Dos cinco cães, apenas um (G1A1) não apresentou título no período analisado. Os títulos apresentados pelos animais desse grupo variaram de 20 a 1.280. Na Tabela 2 estão apresentados os títulos dos cães que permaneceram infectados durante quinze dias e que constituíram o grupo dois do protocolo experimental (G2). Nesse grupo, todos os animais apresentaram títulos detectáveis na prova de SAM durante o período de estudo, os quais variaram de 10 a 1.280.

A Tabela 3 mostra os títulos sorológicos obtidos dos animais do grupo três (G3), avaliados durante trinta dias. Os cinco cães infectados apresentaram títulos que variaram de 160 a 1.280. Na Tabela 4 são verificados os títulos do quarto grupo experimental (G4), no qual os cães infectados foram observados por quarenta e cinco dias. No grupo quatro (G4), em todos os animais foi possível a detecção de anticorpos, com títulos que variaram de 20 a 2.560.

A coloração do ejaculado dos cães infectados e controle nos quatro grupos experimentais variou de branco-opalescente a branco-leitosa durante o período de estudo.

Nas Tabelas 5, 6, 7 e 8 estão apresentados os resultados dos exames andrológicos dos grupos experimentais G1, G2, G3 e G4, respectivamente, em que são comparados os valores das médias para volume, turbilhamento, motilidade, vigor e concentração, de cães infectados (CI) e controle (CC), de cada grupo, para verificar possível diferença significativa entre esses valores, durante o período experimental.

No G1 (Tabela 5) nota-se que não houve diferença significativa para os

parâmetros analisados durante os sete dias de infecção. Entretanto, para o G2 (Tabela 6) a variável espermática da motilidade foi significativamente maior nos CC ($p < 0,01$) aos quinze dias após a infecção. As médias de vigor para os CC também foram superiores às dos CI nos dias três ($p < 0,05$), cinco ($p < 0,05$) e quinze ($p < 0,01$). As médias de concentração espermática dos CC foram significativamente superiores nos dias três ($p < 0,01$), cinco ($p < 0,01$), sete ($p < 0,05$), dez ($p < 0,01$) e quinze ($p < 0,05$).

Já na Tabela 7, observam-se os parâmetros andrológicos do G3, no qual somente a concentração espermática revelou médias significativamente maiores para os animais controle nos dias sete ($p < 0,05$), dez ($p < 0,05$) e quinze ($p < 0,01$) do período experimental. Já para o G4 (Tabela 8), no qual os animais permaneceram infectados durante quarenta e cinco dias, observa-se que a média da motilidade foi significativamente superior nos animais-controle ($p < 0,05$) no décimo quinto dia de infecção.

Nas Tabelas 9, 10, 11 e 12 estão apresentados, respectivamente, os resultados da PCR das amostras de sêmen dos cães infectados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, dos quatro grupos experimentais. A PCR foi negativa para todos os animais utilizados como controle.

É possível observar na Tabela 9 que, dos cinco cães infectados (G1), foi possível detectar DNA de leptospira em um animal (G1A2) no terceiro, quinto e sétimo dias após a inoculação da bactéria. Entretanto, para o G2 (Tabela 10), por intermédio da PCR detectou-se DNA bacteriano no sêmen de todos os animais inoculados, sendo aos quinze dias após a inoculação para o animal um (G2A1), nos dias sete, dez e quinze para o animal dois (G2A2), no décimo quinto dia para o animal três (G2A3), nos dias três e cinco para o animal quatro (G2A4) e nos dias três e quinze para o cão infectado de número cinco (G2A5).

Os resultados da PCR dos animais do G3 (Tabela 11) explicitam que foi possível detectar DNA nas amostras de sêmen de todos os animais infectados com leptospira. No animal um (G3A1), nos dias cinco, sete e quinze. Para o animal dois (G3A2), do sétimo ao vigésimo quinto dias de coleta. Nos dias três, cinco e sete, para o animal três (G3A3). No terceiro, quinto, décimo, vigésimo quinto e trigésimo dias, para o animal quatro (G3A4), e nos dias cinco e dez, após a inoculação bacteriana, para o animal cinco (G3A5).

Podem-se observar na Tabela 12 os resultados da PCR no sêmen dos cinco animais infectados do G4. Foi possível detectar DNA de leptospira nas amostras de todos os cães inoculados. Para o animal um (G4A1) o resultado da PCR foi positivo nos dias sete, quinze, vinte, vinte e cinco e trinta de coleta. Nos dias três e do sétimo ao quadragésimo quinto, para o animal dois (G4A2). Nos dias três, dez, quinze, vinte e quarenta, para o animal três (G4A3). Para o animal quatro, (G4A4) as amostras de sêmen foram positivas nos dias três, cinco, sete, dez, vinte, vinte e cinco, trinta e cinco e quarenta de inoculação. Já o animal número cinco (G4A5) apresentou amostras de sêmen positivas à PCR nos dias sete e vinte e cinco, pós-infecção.

Nas Tabelas 13, 14, 15 e 16 estão os resultados das concentrações plasmáticas de testosterona dos grupos G1, G2, G3 e G4, em que são comparados os valores das médias dos cães infectados (CI) e controle (CC). Em nenhum grupo analisado houve diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de testosterona, nos animais infectados e controle, durante o período de estudo.

Da mesma forma, pela técnica de Levaditi, não foram observadas leptospiras em nenhum dos cortes histológicos de testículo de cães infectados e controle (Tabelas 17, 18, 19 e 20).

A Figura 1 mostra o resultado da PCR na amostra de sêmen do cão G1A2 (Grupo um, animal infectado dois). Nela percebe-se que foi possível detectar DNA de leptospira nas amostras de sêmen coletadas nos dias três, cinco e sete, do referido animal.

A Figura 2 ilustra o resultado da PCR da amostra de sêmen do cão G4A2 (Grupo quatro, animal infectado dois), se observa que somente as amostras coletadas nos dias zero e cinco do período experimental foram negativas.

O limiar de detecção de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, por PCR, a partir do DNA extraído com isotiocianato de guanidina, da amostra de sêmen pura (sem diluição) e experimentalmente contaminada, está apresentado na Figura 3. Pode-se observar que o menor número que pôde ser detectado foi de 10 leptospiras por mL de sêmen.

Tabela 1. Títulos de anticorpos antileptospira sorovar Canicola de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de sangue com relação ao dia da inoculação			
	0	03	05	07
G1A1	-	-	-	-
G1A2	-	-	160	1.280
G1A3	-	20	160	320
G1A4	-	-	320	1.280
G1A5	-	20	80	640

G1: grupo 1, A: animal infectado

-: ausência de reação

Tabela 2. Títulos de anticorpos antileptospira sorovar Canicola de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de sangue com relação ao dia da inoculação					
	0	03	05	07	10	15
G2A1	-	10	160	640	1.280	1.280
G2A2	-	-	20	160	320	1.280
G2A3	-	40	80	160	320	320
G2A4	-	10	20	80	320	640
G2A5	-	20	20	160	160	640

G2: grupo 2, A: animal infectado

-: ausência de reação

Tabela 3. Títulos de anticorpos antileptospira sorovar Canicola de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de sangue com relação ao dia da inoculação								
	0	03	05	07	10	15	20	25	30
G3A1	-	-	640	1.280	1.280	1.280	1.280	640	640
G3A2	-	-	160	320	640	640	1.280	1.280	1.280
G3A3	-	-	160	320	320	320	320	640	320
G3A4	-	-	160	320	640	1.280	1.280	1.280	640
G3A5	-	-	320	320	320	1.280	1.280	1.280	1.280

G3: grupo 3, A: animal infectado

-: ausência de reação

Tabela 4. Títulos de anticorpos antileptospira sorovar Canicola de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de sangue com relação ao dia da inoculação											
	0	03	05	07	10	15	20	25	30	35	40	45
G4A1	-	-	160	320	320	1.280	320	640	640	640	320	640
G4A2	-	20	640	1.280	1.280	2.560	1.280	2.560	1.280	2.560	640	640
G4A3	-	-	320	640	1.280	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560	1.280	1.280
G4A4	-	-	-	80	160	1.280	1.280	2.560	2.560	2.560	2.560	1.280
G4A5	-	-	640	1.280	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560

G4: grupo 4, A: animal infectado

-: ausência de reação

Tabela 5. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento (0 a 5), da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007

Parâmetros		Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação					
		0	03	05	07		
Volume	CI	Média	4,2	10,7	2,5	2,3	
		EP	1,6	7,3	0,7	0,3	
	CC	Média	2,5	3,6	4,1	2,8	
		EP	1	1,8	2,9	1,1	
	Turbilhonamento	CI	Média	4	3,6	3,4	3,8
			EP	0,6	0,2	0,6	0,5
CC		Média	3	4	2	2,6	
		EP	0	1	1,1	0,3	
Motilidade	CI	Média	92,6	77	77	81,6	
		EP	2,7	8	14,3	13,1	
	CC	Média	81,6	73,3	45	71,6	
		EP	10,9	21,6	27,5	10,9	
Vigor	CI	Média	4,4	4,2	3,8	4,4	
		EP	0,4	0,3	0,7	0,6	
	CC	Média	3,3	4	2,3	3	
		EP	0,3	1	1,4	0,5	
Concentração	CI	Média	543,8	317	340	307	
		EP	130,1	39,2	72,9	23,1	
	CC	Média	271,6	405	286,6	310	
		EP	18,5	45,3	154,5	25,6	

Tabela 6. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento (0 a 5), da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação							
		0	03	05	07	10	15		
Volume	CI	Média	2,3	1,8	2,4	2,5	1,9	3	
		EP	0,4	0,2	0,7	0,2	0,5	0,6	
	CC	Média	2	1,9	1,7	2	2,1	2,3	
		EP	0,2	0,06	0,2	0	0,1	0,3	
	Turbilhonamento	CI	Média	2,6	3	3,4	4,2	2,6	3,4
			EP	0,6	0,3	0,2	0,3	0,6	0,2
CC		Média	3	3,6	3,6	3,3	3,6	4	
		EP	0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	
Motilidade		CI	Média	68	61	83	80	60	63
			EP	16,3	13,1	3,7	5,7	15,7	4,8
	CC	Média	91,6	90	91,6	83,3	90	90**	
		EP	1,6	0	1,6	6,6	0	0	
	Vigor	CI	Média	3,2	3,4	3,6	4,8	3,2	3,6
			EP	0,6	0,5	0,2	0,2	0,9	0,2
CC		Média	3,6	5*	4,6*	4,6	4,6	5**	
		EP	0,3	0	0,3	0,3	0,3	0	
Concentração		CI	Média	461	171	214	186	133	211
			EP	187,1	48,2	51,5	44,4	59,8	74,6
	CC	Média	441	521,6**	578,3**	426,6*	476,6**	553,3*	
		EP	70,8	32,1	88,5	63,5	14,5	63,5	

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Tabela 7. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento (0 a 5), da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação										
		0	03	05	07	10	15	20	25	30		
Volume	CI	Média	2,8	2	2,1	1,8	2,3	1,9	2,2	1,9	1,7	
		EP	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	
	CC	Média	2,3	2,3	2,1	2,3	2,3	2,1	2,1	2,1	2	
		EP	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	
	Turb.	CI	Média	4	4,2	4,2	4,2	4,2	4	4,4	4,2	4,2
			EP	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,3
CC		Média	4,6	4,3	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,3	4,3	
		EP	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	
Motilidade		CI	Média	80	82	86	85	78	71	75	77	83
			EP	6,5	4	4,3	5,2	4,6	7,4	5	4,8	4,6
	CC	Média	85	85	90	90	90	90	88,3	86,6	88,3	
		EP	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	1,6	1,6	1,6	
Vigor	CI	Média	4,6	4,8	4,6	4,6	4,2	4,4	4,4	4,4	3,8	
		EP	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2	0,4	0,2	
	CC	Média	5	5	5	5	4,3	5	5	5	4,6	
		EP	0	0	0	0	0,6	0	0	0	0,3	
Conc.	CI	Média	335	394	326	247	320	262	458	457	523	
		EP	86,9	80,1	78,6	51,9	42,2	48,1	66	70,9	110,1	
	CC	Média	535	588,3	586,6	491,6*	546,6*	620**	661,6	693	556,6	
		EP	43,6	39,4	38,4	79,9	36,6	63,5	101,7	132,2	32,8	

Turb.: Turbilhonamento, Conc.: Concentração

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Tabela 8. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento (0 a 5), da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação													
		0	03	05	07	10	15	20	25	30	35	40	45		
Vol.	CI	Média	2,1	2,3	2,8	2,7	2,4	2,1	2,1	3,1	2,4	2,4	3	2,4	
		EP	0,1	0,2	0,4	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,6	0,2	
	CC	Média	2,1	2,6	3,6	2,2	3	1,7	3,2	3,2	2	1,7	1,7	2,2	
		EP	0,4	0,1	0,7	0,2	0,5	0,2	0,7	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	
	Turb.	CI	Média	3,8	3	4	4,4	3,6	3,4	3,8	3,8	3,6	4,2	4	3,4
			EP	0,3	0	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,8
CC		Média	4	2,3	2,6	3,5	4	4	3,5	3	4	3	3	2	
		EP	0,5	1,2	1,3	0,5	0	0	0,5	0	0	1	1	2	
Mot.		CI	Média	71,8	86	80,8	89,8	81	75	84	77	76	79	83	70
			EP	8,4	2,9	6	3,3	5	4,4	6,2	4,6	9,1	4	3,7	12,7
	CC	Média	81,6	50	60	77,5	90	90*	70	70	92	60	62	45	
		EP	6	25,1	30,1	7,5	0	0	20	5	2,5	15	17,5	35	
	Vigor	CI	Média	4,4	4,6	4,4	4,8	4,6	3,6	4,4	4,4	4	4,6	4,6	4,2
			EP	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,5
CC		Média	4,3	2,3	3	4,5	5	4,5	4	3,5	4,5	4	4	2,5	
		EP	0,3	1,2	1,5	0,5	0	0,5	1	0,5	0,5	1	1	1,5	
Conc.		CI	Média	285	377	197	202	248	353	518	426	302	329	297	280
			EP	49,8	183	26,3	16,7	55,5	28,2	170	129	40	42,4	56	33,4
	CC	Média	483	225	235	145	207	275	430	347	345	487	525	407	
		EP	122	148	118	20	12,5	10	350	47,5	35	127,5	75	12,5	

Vol.: Volume, Turb.: Turbilhonamento, Mot.: Motilidade, Conc.: Concentração

* $p < 0,05$

Tabela 9. Resultado da PCR para amostras de sêmen de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação			
	0	03	05	07
G1A1	N	N	N	N
G1A2	N	P	P	P
G1A3	N	N	N	N
G1A4	N	N	N	N
G1A5	N	N	N	N

G1: grupo 1, A: animal infectado

N: negativo

P: positivo

Tabela 10. Resultado da PCR para amostras de sêmen de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação					
	0	03	05	07	10	15
G2A1	N	N	N	N	N	P
G2A2	N	N	N	P	P	P
G2A3	N	N	N	N	N	P
G2A4	N	P	P	N	N	N
G2A5	N	P	N	N	N	P

G2: grupo 2, A: animal infectado

N: negativo

P: positivo

Tabela 11. Resultado da PCR para amostras de sêmen de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação								
	0	03	05	07	10	15	20	25	30
G3A1	N	N	P	P	N	P	N	N	N
G3A2	N	N	N	P	P	P	P	P	N
G3A3	N	P	P	P	N	N	N	N	N
G3A4	N	P	P	N	P	N	N	P	P
G3A5	N	N	P	N	P	N	N	N	N

G3: grupo 3, A: animal infectado

N: negativo

P: positivo

Tabela 12. Resultado da PCR para amostras de sêmen de cinco cães infectados experimentalmente com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação											
	0	03	05	07	10	15	20	25	30	35	40	45
G4A1	N	N	N	P	N	P	P	P	P	N	N	N
G4A2	N	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G4A3	N	P	N	N	P	P	P	N	N	N	P	N
G4A4	N	P	P	P	P	N	P	P	N	P	P	N
G4A5	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N

G4: grupo 4, A: animal infectado

N: negativo

P: positivo

Tabela 13. Média aritmética, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) e erro padrão (EP) das concentrações plasmáticas de testosterona (ng/dL) de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Tempo		D0	D3	D5	D7
CI	Média	217,46	329,53	300,67	374,61
	Mín.	45,69	49,73	45,69	53,6
	Máx.	307,52	598,64	493,59	1088,2
	EP	45,17	99,42	80,02	193,15
CC	Média	253,33	303,43	258,77	293,98
	Mín.	120,52	290,57	166,32	29,88
	Máx.	344,88	316,29	351,21	599
	EP	67,97	12,86	92,44	165,56

Tabela 14. Média aritmética, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) e erro padrão (EP) das concentrações plasmáticas de testosterona (ng/dL) de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Tempo		D0	D3	D5	D7	D10	D15
CI	Média	180,85	264	446,98	384,22	326,52	222,51
	Mín.	55,03	82,19	250,24	16,54	11,73	73,9
	Máx.	290,15	378,74	656,08	651,97	569,87	385,77
	EP	48,42	64,84	89,98	133,06	126,13	63,83
CC	Média	280,59	279,76	203,5	247,63	233,64	246,82
	Mín.	239,68	225,48	120,52	120,52	166,67	193,25
	Máx.	307,52	344,88	290,15	344,88	294,58	307,52
	EP	20,79	34,89	49	66,46	37,04	33,17

Tabela 15. Média aritmética, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) e erro padrão (EP) das concentrações plasmáticas de testosterona (ng/dL) de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Tempo		D0	D3	D5	D7	D10	D15	D20	D25	D30
CI	Média	365,52	419,96	648,99	320,53	385,59	311,61	473,19	191,55	282,73
	Mín.	167,23	39,36	180,04	47,73	64,34	39,08	178,76	57,95	124,28
	Máx.	746,22	989,83	1025,7	592,64	935,68	1006	1221,8	464,95	620,07
	EP	103,16	157,95	166,68	97,42	158,83	181,6	196,74	75,11	90,34
CC	Média	246,13	313,33	267,69	300,43	157,76	178,6	300,26	129,03	144,18
	Mín.	127,36	268,92	206,57	285,57	11,36	66,63	294,58	78,74	23,54
	Máx.	344,88	344,88	305,94	312,29	247,47	290,57	305,94	166,67	294,58
	EP	63,58	22,85	30,88	11,86	73,81	111,97	5,68	26,15	79,64

Tabela 16. Média aritmética, valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) e erro padrão (EP) das concentrações plasmáticas de testosterona (ng/dL) de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Tempo		D0	D3	D5	D7	D10	D15	D20	D25	D30	D35	D40	D45
CI	Média	130,73	163,11	291,33	178,75	230,4	135,38	223,32	249,86	315,44	157,69	166,03	373,2
	Mín.	54,46	49,99	166,01	65,73	62,46	47,19	68,63	121,83	229,52	58,54	34,34	67,26
	Máx.	355,18	281,01	400,11	292,25	378,45	215,6	312,74	376,92	431,08	361,24	377,87	714,6
	EP	56,46	36,85	37,4	48,61	58,81	29,66	42,52	51,27	39,95	54,76	58,92	117,4
CC	Média	197,75	290,87	174,32	188	166,36	141,97	167,61	171,25	215,67	250,83	195,73	269,0
	Mín.	114,42	261,58	96,64	46,44	141,67	108,5	127,36	17,2	66,63	214,44	88,91	206,5
	Máx.	294,58	344,88	305,81	277,48	190,75	193,25	228,26	326,2	290,57	290,57	351,21	305,9
	EP	52,44	27,03	66,1	71,6	14,16	26,03	30,86	89,2	74,51	22,04	79,53	31,4

Tabela 17. Resultados obtidos na detecção do sorovar Canicola pela técnica de Levaditi no testículo de cães infectados e controles, após sete dias de infecção, de acordo com a titulação de anticorpos homólogos no dia da eutanásia, representando o grupo experimental um (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Animal	Título	Resultado
G1A1	-	N
G1A2	1.280	N
G1A3	320	N
G1A4	1.280	N
G1A5	640	N
G1C1	-	N
G1C2	-	N
G1C3	-	N

G1: grupo 1, A: animal infectado, C: animal controle

-: ausência de reação, **N**: ausência de leptospira

Tabela 18. Resultados obtidos na detecção do sorovar Canicola pela técnica de Levaditi no testículo de cães infectados e controles, após 15 dias de infecção, de acordo com a titulação de anticorpos homólogos no dia da eutanásia, representando o grupo experimental dois (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Animal	Título	Resultado
G2A1	1.280	N
G2A2	1.280	N
G2A3	320	N
G2A4	640	N
G2A5	640	N
G2C1	-	N
G2C2	-	N
G2C3	-	N

G2: grupo 2, A: animal infectado, C: animal controle

-: ausência de reação, **N**: ausência de leptospira

Tabela 19. Resultados obtidos na detecção do sorovar Canicola pela técnica de Levaditi no testículo de cães infectados e controles, após 30 dias de infecção, de acordo com a titulação de anticorpos homólogos no dia da eutanásia, representando o grupo experimental três (G3). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Animal	Título	Resultado
G3A1	640	N
G3A2	1.280	N
G3A3	320	N
G3A4	640	N
G3A5	1.280	N
G3C1	-	N
G3C2	-	N
G3C3	-	N

G3: grupo 3, A: animal infectado, C: animal controle

-: ausência de reação, **N**: ausência de leptospira

Tabela 20. Resultados obtidos na detecção do sorovar Canicola pela técnica de Levaditi no testículo de cães infectados e controles, após 45 dias de infecção, de acordo com a titulação de anticorpos homólogos no dia da eutanásia, representando o grupo experimental quatro (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Animal	Título	Resultado
G4A1	640	N
G4A2	640	N
G4A3	1.280	N
G4A4	1.280	N
G4A5	2.560	N
G4C1	-	N
G4C2	-	N
G4C3	-	N

G4: grupo 4, A: animal infectado, C: animal controle

-: ausência de reação, **N**: ausência de leptospira

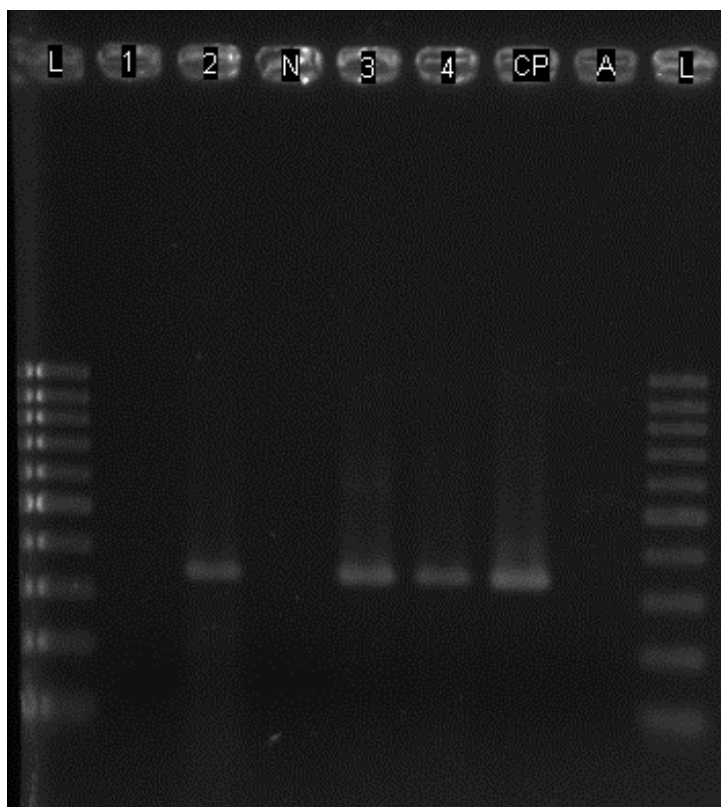


Figura 1. Resultado da PCR para amostra de sêmen do cão G1A2 (Grupo um, animal infectado dois). L) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 bp; 1) dia zero; 2) dia três; 3) dia cinco; 4) dia sete; N) controle negativo do processo de extração do DNA; A) controle negativo da PCR; CP (controle positivo). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

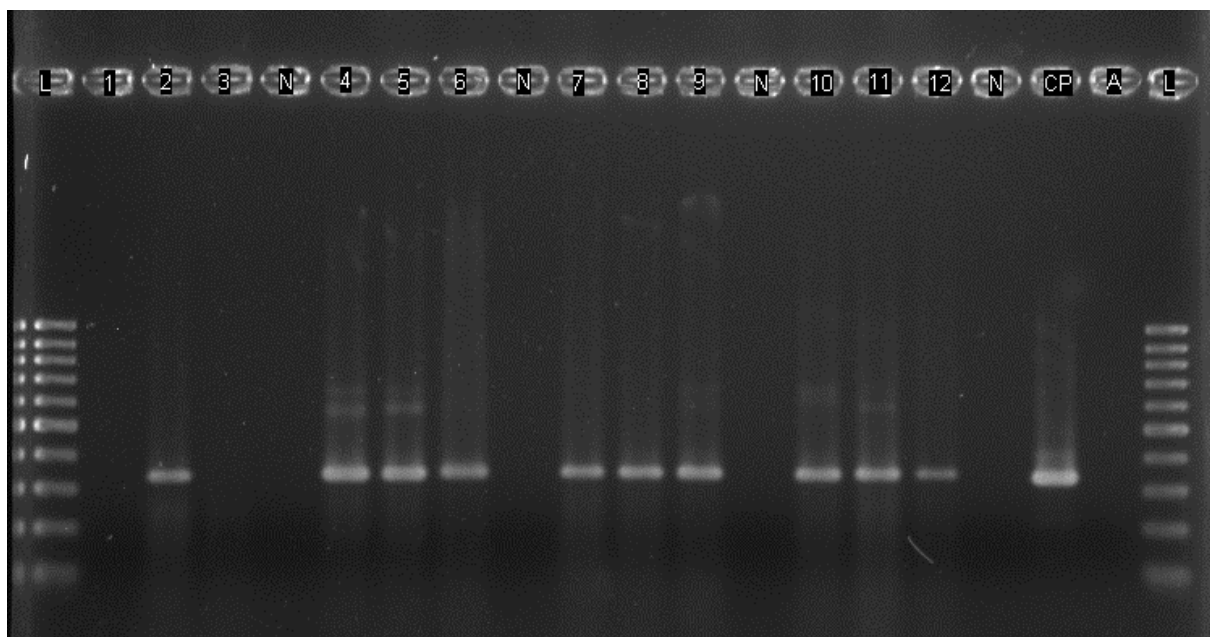


Figura 2. Resultado da PCR da amostra de sêmen do cão G4A2 (Grupo quatro, animal infectado dois). L) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 bp; 1) dia zero; 2) dia três; 3) dia cinco; 4) dia sete; 5) dia dez; 6) dia quinze; 7) dia vinte; 8) dia vinte e cinco; 9) dia trinta; 10) dia trinta e cinco; 11) dia quarenta; 12) dia quarenta e cinco; N) controle negativo do processo de extração do DNA; A) controle negativo da PCR; CP (controle positivo). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

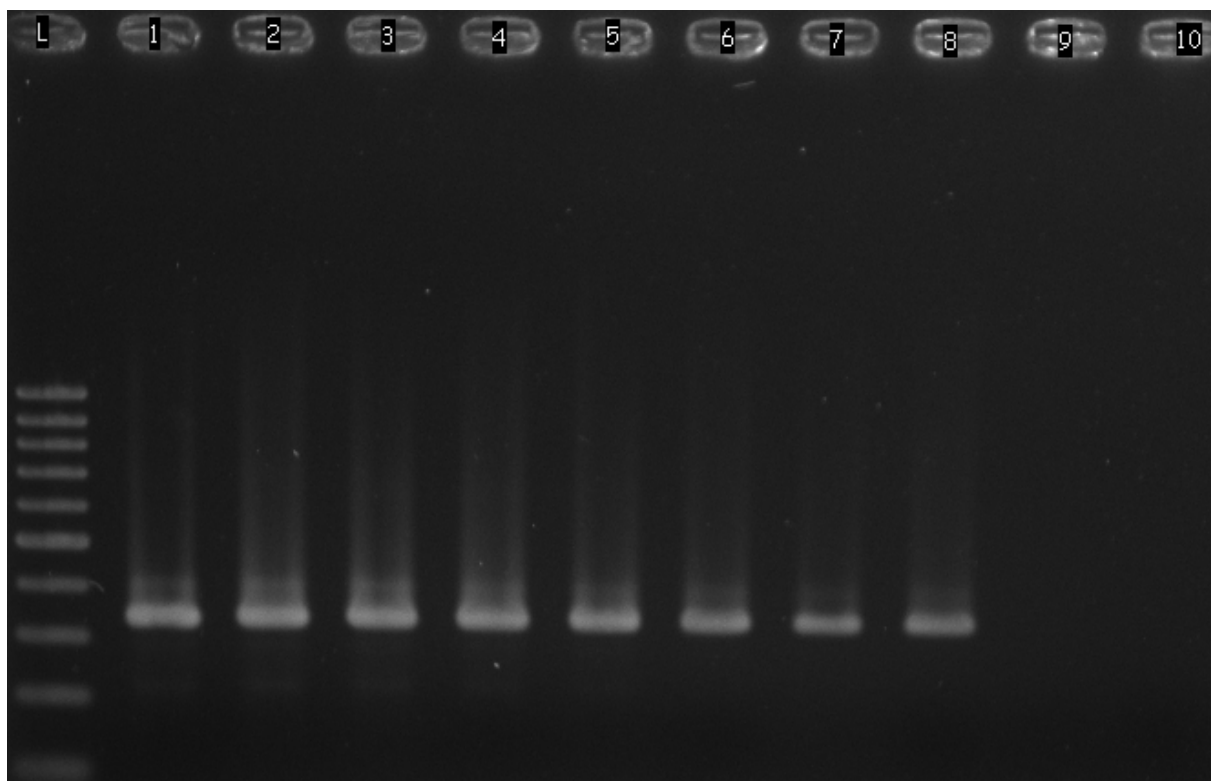


Figura 3. Limiar de detecção de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola por PCR, a partir do DNA obtido pela técnica de extração com isotiocianato de guanidina, de amostras de sêmen canino experimentalmente contaminado. 1) Cultura pura com 10^8 leptospiras por mL; 2) Sêmen com 10^7 leptospiras por mL; 3) Sêmen com 10^6 leptospiras por mL; 4) Sêmen com 10^5 leptospiras por mL; 5) Sêmen com 10^4 leptospiras por mL; 6) Sêmen com 10^3 leptospiras por mL; 7) Sêmen com 10^2 leptospiras por mL; 8) Sêmen com 10^1 leptospiras por mL; 9) Sêmen com 10^0 leptospiras por mL; 10) controle negativo da PCR. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

5 – DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento realçaram aspectos relevantes, cuja discussão é apresentada a seguir.

Os animais utilizados no presente experimento não apresentavam alterações clínicas e reprodutivas e foram submetidos ao mesmo tipo de manejo e alimentação com o intuito de evitar a ocorrência de mudanças hormonais e seminais não inerentes ao tratamento.

De acordo com QUINN et al. (1994) e FAINE (1994), os diferentes sorovares de *L. interrogans* não apresentam especificidade de hospedeiro, porém existe a preferência de certos sorovares por determinados vertebrados. Exemplo dessa condição é a associação estabelecida entre o cão doméstico e o sorovar Canicola. Essa condição aliada aos vários inquéritos sorológicos que indicam esse sorovar como um dos principais causadores da leptospirose canina (FURTADO et al., 1997; ÁVILA et al., 1998; JOUGLARD e BROD, 2000; MASCOLLI et al., 2002; BATISTA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2006) motivaram a utilização desse sorovar no presente estudo.

A confirmação da indução da leptospirose nos cães experimentalmente infectados ficou caracterizada pelos títulos de anticorpos obtidos na prova de SAM, caracterizando a “performance” da virulência da cepa utilizada e assegurando o primeiro parâmetro assentado no delineamento da investigação, que foi o de estabelecer uma população que tivesse um contato efetivo com a leptospira.

REBHUN (1995) relata que o período de incubação da leptospirose é de sete a 14 dias, período em que ocorre septicemia e produção de anticorpos. Essa afirmação explica o fato de o animal G1A1 (Tabela 1) não apresentar título de anticorpos durante o período de sete dias que permaneceu infectado.

A ausência de anticorpos nos animais não infectados (grupos controle) constitui um outro dado importante demonstrado no experimento, comprovando a qualidade das medidas adotadas no ambiente em relação às instalações e ao manejo sanitário.

Nenhum dos cães infectados veio a óbito em decorrência da infecção por

leptospira, porém esses animais continuavam a eliminar bactérias para o meio ambiente, o que demonstra a importância do cão doméstico na cadeia epidemiológica da leptospirose urbana, assim como observado por VASCONCELLOS (1987) e FAINE et al. (1999).

Uma das preocupações deste trabalho foi avaliar a qualidade do sêmen dos cães experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola com relação àquela apresentada por animais-controle.

A coloração do sêmen dos cães infectados e controle dos quatro grupos experimentais variou de branco-opalescente a branco-leitosa, sendo considerada normal (ROOT e JOHNSTON, 1994).

Com relação aos parâmetros andrológicos de volume, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração, as maiores diferenças foram observadas nos grupos dois e três (Tabelas 6 e 7). No grupo dois foi verificada uma queda significativa nos valores do vigor e da concentração espermática, nos cães infectados, durante grande parte do período de estudo. Já no grupo três, somente a concentração foi significativamente inferior nos animais infectados, em três dos nove dias de colheita de sêmen. Esses dados concordam em parte com os achados de KIKTENKO et al. (1976), que puderam observar que touros infectados apresentaram inibição dos reflexos sexuais e perdas na qualidade do sêmen, com queda na concentração e na motilidade, diminuição do volume do ejaculado e necrospemia. Porém no presente estudo não foi possível relacionar a presença de infecção com diminuição do volume do ejaculado.

A SAM, apesar de ser a técnica mais utilizada para o diagnóstico da leptospirose, apresenta algumas falhas, tais como a dificuldade na obtenção de resultados concordantes entre laboratórios (THIERMANN, 1984), além de ser uma técnica laboriosa que exige o uso de leptospirosas vivas como antígenos (CHAPPEL et al., 1998).

Devido às falhas da SAM e à dificuldade do cultivo de *Leptospira* spp. para o isolamento a partir de diversos materiais (BOLIN et al., 1989), a PCR passa a ser uma nova opção de diagnóstico, por ser considerada rápida e extremamente sensível, podendo teoricamente detectar uma única molécula de DNA em poucas horas (GILLESPIE, 1990).

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a PCR na detecção de leptospiras em sêmen de cães infectados experimentalmente. Para tanto, preferiu-se utilizar os oligonucleotídeos iniciadores Lep 1 e Lep 2, sintetizados por MÉRIEN et al. (1992) a partir da seqüência do gene 16S rRNA de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, determinada por FUKUNAGA et al. (1990), devido ao fato desses “primers” serem gênero específicos e permitirem a amplificação de vários sorovares de leptospiras apatogênicas e patogênicas (HEINEMANN, 1995).

Neste trabalho foi possível detectar DNA de leptospira no sêmen de dezesseis dos vinte cães inoculados com a cepa de *L. interrogans* sorovar Canicola. Esse resultado concorda com vários outros autores que relatam sucesso na detecção de *Leptospira* spp. pela PCR em sêmen de touros (HEINEMANN, 1995; MASRI et al., 1997; HEINEMANN et al., 2000) e sêmen canino experimentalmente infectado (KIM et al., 2006). Impressões contrárias foram descritas por MAGAJEVSKI et al. (2005), que, estudando amostras pareadas de sêmen e urina de 10 touros naturalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Hardjo, detectaram DNA de leptospira em apenas uma amostra de urina e em nenhuma das amostras de sêmen.

KEE et al. (1994) puderam detectar *L. interrogans* no sangue de sagüi (*Merionis unguiculatus*) dois dias após a infecção experimental, enquanto anticorpos só foram detectados pela SAM sete dias pós-infecção. No presente estudo, em oito dos dezesseis animais nos quais detectou-se DNA de leptospira por PCR do sêmen, a amostra mostrou-se positiva no terceiro dia pós-infecção, e cinco dos oito cães não apresentavam títulos de anticorpos detectáveis na prova de SAM nesse período. Esses resultados concordam com os achados de HARKIN et al. (2003a), que consideram a PCR uma importante ferramenta no diagnóstico precoce da leptospirose.

O limiar de detecção de leptospiras pela técnica de PCR, em sêmen canino experimentalmente contaminado, utilizada no presente estudo foi de 10 bactérias por mL de sêmen. Resultados semelhantes foram obtidos por HEINEMANN (1995) em sêmen bovino. Entretanto KIM et al. (2006), trabalhando com contaminação experimental de sêmen canino com *Leptospira interrogans*, conseguiram um limiar de detecção de 1.000 bactérias por mL de sêmen utilizando a PCR convencional. Os

mesmos autores, após submeter o material a uma Nested PCR, atingiram um limiar de detecção de 100 bactérias por mL de sêmen.

VELOSO et al. (2000) relataram que o procedimento de extração do DNA do material que se deseja avaliar e o “primer” utilizado podem propiciar diferentes resultados à técnica de PCR.

Devido à importância da testosterona na espermatogênese e em todos os processos que envolvem a reprodução nos machos (JOHNSON, 1994), um dos objetivos do estudo em tela foi relacionar a presença de infecção por leptospira e a concentração de testosterona plasmática. Neste trabalho, não foi possível correlacionar a infecção por *L. interrogans* sorovar Canicola com a diminuição dos níveis sanguíneos de testosterona nos animais infectados, quando comparados àqueles dos cães utilizados como controle. Esses resultados discordam dos de DHALIWAL et al. (1997), que relataram diminuição dos níveis plasmáticos de progesterona em vacas experimentalmente infectadas. Discordam, também, dos achados de ADULKADER et al. (1996), que, em seres humanos, observaram variações nos níveis de cortisol e aldosterona em pacientes com leptospirose. Não existem relatos na literatura que relacionem a presença de infecção por leptospira e os níveis de testosterona circulante em qualquer espécie animal.

A eficácia da técnica de Levaditi em revelar a presença das leptospiros em órgãos como fígado e rins já foi mencionada por autores como FAINE (1982) e ZAMORA (1995), os quais verificaram que a coloração pelos sais de prata possibilita uma melhor visualização das leptospiros no parênquima tecidual dos referidos órgãos.

Embora diversos autores (CAMARGO et al., 1993; CAMARGO, 1996; BRANDESPIM et al., 2003) considerem a técnica de Levaditi eficaz no diagnóstico de *Leptospira* spp. em órgãos do aparelho reprodutor de machos e fêmeas, no presente estudo não foi possível detectar leptospiros nos fragmentos de testículos de cães experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola.

6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e analisados, nas condições em que foi realizado o presente estudo, e segundo a metodologia empregada, possibilitam as seguintes conclusões:

1. Não foram observadas alterações nas concentrações plasmáticas de testosterona em cães infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, até o período de 45 dias pós-infecção.
2. É possível detectar DNA de leptospira, pela técnica de PCR, em sêmen de cães experimentalmente infectados.
3. Cães experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola mostram declínios da motilidade, do vigor e da concentração espermática.
4. Não foi possível verificar a presença de leptospiras nos testículos de cães experimentalmente infectados pela técnica de coloração de Levaditi, eutanasiados até 45 dias após a inoculação da cepa patogênica.
5. O limiar de detecção de leptospira pela técnica de extração de DNA com isotiocianato de guanidina é de 10 bactérias por mL de sêmen experimentalmente contaminado.

7 – REFERÊNCIAS

ABDULKADER, R.C.; SEGURO, A.C.; MALHEIRO, P.S.; BURDMANN, E.A.; MARCONDES, M. Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 54, n. 1, p. 1-6, 1996.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 Ed. Washington: **Organizacion Panamericana de la Salud**, 1986. (Publicación Científica n. 503). p. 112-120: Leptospiriosis.

ALLEN, J.A.; DIEMER, T.; JANUS, P.; HALES, K.H.; HALES, D.B. Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria. **Endocrine**, New York, v. 25, n. 3, p. 265-275, 2004.

AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F.; PATH, M. R. C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, New York, v. 45, n. 12, p. 875 – 891, 1975.

ÁVILA, M.O.; FURTADO, L.R.I.; TEXEIRA, M.M. Aglutininas anti-leptospira em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 107-110, 1998.

BARATON, G.; POSTIC, D. **Méthodes de Laboratoire**: leptospirose, borreliose de Lyme. Paris: Instituto Pasteur, 1989. 107p.

BATISTA, C.S.A.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; CLEMENTINO, I.J.; ALVES, F.A.L.; LIMA, F.S.; ARAÚJO NETO, J.O. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, supl. 2, p. 179-185, 2005.

BIRNBAUM, N.; BARR, S.C.; CENTER, S.; SCHERMERHORN, T.; RANDOLPH, J.F.; SIMPSON, K.W. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 39, n. 5 p.

231-236, 1998.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* tipo *hardjo-bovis* in bovine urine. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, n. 7, p. 1001-1003, 1989.

BRANDESPIM, D.F.; GÍRIO, R.J.S.; LOPES, F.L.; MAGAJEVSKI, F.S.; NÜRMBERGER JR, R.; ALESSI, A.C. Infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorovar *pomona* em hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos: alterações estruturais e avaliação das técnicas de Levaditi e Imunoistoquímica. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 272 – 279, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de controle de zoonoses e animais peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. 2. ed. Brasília, 1995. 98p.

CAI, H. Y.; HORNBY, G.; KEY, D. W.; OSUCH, M. R.; MAXIE, M. G. Preliminary study on differentiation of *Leptospira grippotyphosa* and *Leptospira Sejroe* from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 14, n. 2, p. 164-168, 2002.

CAMARGO, C.R.A. **Pesquisa de leptospiros nos ovários, úteros e embriões de hamsters experimentalmente infectados e induzidos à condição de portadores renais, através do tratamento com estolato de eritromicina**. 1996. 79p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

CAMARGO, C.R.A.; VASCONCELLOS, S.A.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; PASSOS, E.C.; MORAIS, Z.M; VISINTIN, J.A. Investigação sobre a presença de leptospiros nos ovários de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and**

Animal Science, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 129-135, 1993.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis**. Washington, 1985. 46p. (Nota Técnica, 30).

CETINKAYA, B.; ERTAS, H.B.; ONGOR, H.; MUZ, A. Detection of leptospira species by polymerase chain reaction (PCR) in urine of cattle. **Turk Veterinerlik ve Hayvancilik Dergisi**, Turquia, v. 24, n.2, p. 123-130, 2000.

CHAPPEL, R. J.; PRIME, R. W.; MILLAR, B. D.; JONES, R. T.; CUTLER, R. S.; ADLER, B. Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar *pomona* slaughtered in abattoir in Victoria, Australia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 235 – 242, 1998.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, Natick, v. 15, n. 3, p. 532-534, 536-537, 1993.

DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; DOBSON, H.; ELLIS, W.A. Effect of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection on progesterone concentrations in heifers. **The Veterinary Record**, London, v. 140, n. 1, p. 19-20, 1997.

DUTTA, T.K.; CHRISTOPHER, M. Leptospirosis – an overview. **Journal of the Association of Physicians of India**, Bombay, v. 53, p. 545-551, 2005.

ELLIS, T.M.; ROBERTSON, G.M.; HUSTAS, L.; KIRBY, M. Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 60, n. 12, p. 364-367, 1983.

ELLIS, W. A.; CASSELS, J. A.; DOYLE, J. Genital leptospirosis in bulls. **Veterinary Record**, London, v. 118, n. 12, p.333, 1986.

FABER, N.A.; CRAWFORD, M.; LEFEBVRE, R.B.; BUYUKMIHCI, N.C.; MADIGAN, J.E.; WILLITS, N.H. Detection of *Leptospira spp.* in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p. 2731-2733, 2000.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Genova: World Health Organization, 1982. 171 p.

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: CRC Press, 1994. 353p.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996. 220p.

FRESHMAN, J.L.; AMANN, R.P.; SODERBERG, S.F.; OLSON, P.N. Clinical evaluation of infertility in dogs. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, Princeton, v. 10, n. 4, p. 443-460, 1988.

FUKUNAGA, M.; HORIE, I.; OKUZAKO, N.; MIFUCHI, I. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene for *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Moulton. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.2, p.366, 1990.

FURTADO, L.R.I; AVILA, M.O.; FEHLBERG, M.F.B. Prevalência e avaliação de fatores de risco à leptospirose canina, no município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 1, p. 57-61, 1997.

GILLESPIE, D. The magic and challenge of DNA probes as diagnostic reagents. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.24, n. 3-4, p.217-233, 1990.

GINGERAS, T. R.; RICHMAN, D. D.; KWOH, D. Y.; GUATELLI, J. C. Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their applications. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.24, n. 3-4, p.235-251, 1990.

GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEN, M. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, London, v. 139, n. 8, p. 1691 – 1700, 1993.

HANSON, L. E. Leptospirosis in domestic animals: The public health perspective. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.181, n.12, p.1505 –1509, 1992.

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 222, n.9, p. 1224-1229, 2003a.

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T.; PURVIS, T. J.; CHENGAPPA, M. M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 222, n. 9, p. 1230-1233, 2003b.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira spp.* serovars in bovine semen by polimerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 261 – 267, 2000.

HEINEMANN, M.B. **Detecção de *Letospira spp.* em sêmen bovino através da reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 1995. 48p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

JOHNSON, L. A new approach to study the architectural arrangement of spermatogenic stages revealed little evidence of a partial wave along the length of

human seminiferous tubules. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 15, n. 5 p. 435–441, 1994.

JOHNSTON, S.D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 545-551, 1991.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and Feline Theriogenology**, 1^a ed. Philadelphia: Saunders, p. 287, 2001a.

JOHNSTON, S.D.; SIRINARUMITR, K.; KUSTRITZ, M.V.; JOHNSTON, G.R.; SARKAR, D.K.; MEMON, M.A. Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.218, n.8, p.1275-1280, 2001b.

JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C.S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 181-185, 2000.

KANEKO, R.; OKUDA K. The distribution in the human body of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 26, p. 325-339, 1917.

KEE, S.; KIM, I.; CHOI, M.; CAANG, W. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.4, p.1035 –1039, 1994.

KIKTENKO, V. S.; BALASHOV, N. G.; RODINA, V. N. Leptospirosis infection through insemination of animals. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, Prague, v.20, n. 2, p.207-213, 1976.

KIM, S.; LEE, D.S.; SUZUKI, H.; WATARAI, M. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by Multiplex Nested PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 6, p. 615-618, 2006.

KMETY, E.; DIKKEN, H. **Classification of the species of *Leptospira interrogans* and history of its serovars**. University Press Groningen, Groningen, The Netherlands, 1993.

MAGAJEVSKI, F.S.; GIRIO, R.J.S.; MATHIAS, L.A.; MYASHIRO, S.; GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.P. Detection of *Leptospira spp.* in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 434-437, 2005.

MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; WILKE, V.M.L.; HADDAD, J.P.A.; MENESES, J.N.C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n.2, p. 167-174, 2006.

MARPLETOFT, R.J. Embryo transfer and genetic engineering. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 51-58.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do Município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 25-32, 2002.

MASRI, S.A.; NGUYEN, P.T.; GALE, P.; HOWARD, C.I.; JUNG, S.C.A. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira spp.* in bovine semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Otawwa, v.61, n.1, p. 15-20, 1997.

MCMANUS, J. F.A.; MOWRY, R. W. **Staining Methods – Histologic and Histochemical**. 3º ed. New York: Harper & Row, 1965. p. 370-371.

MÉRIEN, F.; AMOURIAX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp.* in clinical samples.

Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.30, n.9, p.2219-2224, 1992.

MEYERS-WALLEN, V.N. Clinical approach to infertile male dogs with sperm in the ejaculate. Review. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n.3, p. 609-633, 1991.

NOGUCHI, H. The survival of *Leptospira* (Spirochaeta) *icterohaemorrhagiae* in nature: Observations concerning microchemical reactions and intermediary hosts. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 27, p. 609 – 625, 1918.

OLIVEIRA, S. J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? **Hora Veterinária**, Rio Grande do Sul, v. 19, n. 111, p. 87 – 90, 1999.

OMBELET, W.; MENKVELD, R.; KRUGER, T.F.; STEENO, O. Sperm morphology assessment: Historical review in relation to fertility. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.1, n. 6, p. 543-557, 1995.

PAUL, P. S. Applications of nucleic acid probes in veterinary infectious diseases. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.24, n. 3-4, p.409-417, 1990.

PERRET, P.C.; ABARCA, V. K.; DABANCH, P.J. Risk factors and frequency of positive antibodies for leptospirosis in a sub-urban population near Santiago. **Revista Medica de Chile**, Santiago do Chile, v. 133, n. 4, p. 426-431, 2005.

PERRY, G.; HEARD, R.; RYAN, G.; OLIVER, G.; ROBINSON, B.; MARTIN, R. A scientific review of leptospirosis and implications for quarantine policy-précis. **Australian Quarantine and Inspection Service**, Australia, 91 p., 2000.

PRESCOTT, J. F.; McEWEN, B.; TAYLOR, J.; WOODS, J. P.; ABRANS-OGG, A.; WILCOCK, B. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 43, n. 12, p. 955-961, 2002.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary**

Microbiology. Madri: Grafos, 1994. p. 292 – 303.

REBHUN, W. C. **Diseases of Dairy Cattle.** Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p. 472 – 474.

RICHTZENHAIN, L.J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; VASCONCELLOS, S.A.; HIGA, Z.M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.87, n. 2, p. 139-147, 2002.

ROBERTS, S. J. A study of leptospirosis in a large artificial insemination study. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 48, n. 4, p. 363 – 371, 1958.

RODINA, V. N. Transmission of leptospirosis by artificial insemination. **Veterinary Bulletin**, New York, v. 41, p. 536, 1971.

RODINA, V. N.; BALASHOV, N. G. Leptospirosis infection of animals transmitted through insemination. In: WORLD VETERINARY CONGRESS. **Proceedings of World Veterinary Congress**, Mexico City, v. 2, p. 707 – 708, 1971.

ROOT, M.V.; JOHNSTON, S.D. Basics for a complete reproductive examination of the male dog. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 41-45, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 1 ed., Cold Spring Harbor Press, New York, 1989, 957p.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.1, p. 97-109,1970.

SAS Institute User's Guide: Statistics. Version 5 ed. Cary, 1985. 956p.

SLEIGHT, S. D. The role of penicillin and streptomycin in the prevention of transmission of bovine leptospirosis by artificial insemination. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.26, p.365 – 368, 1965.

SLEIGHT, S. D.; ATALLAH, O. A.; STEINBAUER, D. J. Experimental *Leptospira pomona* infection in bulls. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 25, p.1663 – 1668, 1964.

SLEIGHT, S. D.; WILLIAMS, J. A. Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 138, p. 151 – 152, 1961.

STOENNER, H. G. Application of serologic findings to the diagnosis of leptospirosis. **Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v.76, p.622-634, 1972.

SULZER, C. R.; JONES, W. L. **Leptospirosis: Method in laboratory diagnosis**. Atlanta: Center for Diseases Control, U. S., Dept. Health Education and Welfare, 1980. 40p.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 184, n. 6, p.722 – 725, 1984.

TRUCCOLO, J.; CHARAVAY, F.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 3, p. 848-853, 2002.

VAN EYS, G.J.J.M.; GRAVEKAMP, C.; GERRITSEN, M.J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M.T.E.; TER SCHEGGET, J.; TERPSTRA, W.J. Detection of leptospire in urine by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**,

Washington, v. 27, n.10, p. 2258-2262, 1989.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose em animais domésticos e silvestres – prevenção e controle. **Oficina Estado da Arte e Prioridades para P&D em Leptospirose/FIOCRUZ**, Salvador 10 e 11 de abril de 2000.

VASCONCELLOS, S. O papel dos reservatórios na manutenção de leptospiras na natureza. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 17-24, 1987.

VASCONCELLOS, S.A. Leptospirose animal. In: Encontro Nacional em Leptospirose, Rio de Janeiro, **Anais**. Rio de Janeiro, 1993, p. 62-65.

VELOSO, I.F.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E.; MOREIRA, E.C.A. A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 339-343, 2000.

ZAMORA, J. Comparison of four microscopic techniques for the diagnosis of leptospirosis in wild rodents in the rural area of Valdivia, Chile. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, México, v. 37, n. 3, p. 267-272, 1995.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MAÑÉ, M. C. Characterization of renal damage in canine leptospirosis by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamine gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting of the urinary proteins. **Journal of comparative pathology**, Edinburgh, v. 129, n. 2-3, p. 169-178, 2003.