

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

COMPROMETIMENTO FISIOLÓGICO E SEMINAL DE
CÃES MACHOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
POR *Leptospira interrogans* SOROVAR CANICOLA

Halim Atique Netto
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Novembro de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

COMPROMETIMENTO FISIOLÓGICO E SEMINAL DE
CÃES MACHOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
POR *Leptospira interrogans* SOROVAR CANICOLA

Orientado: Halim Atique Netto

Orientador: Prof. Dr. Raul Jose Silva Girio

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção de Título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2008

A872c

Atique Netto, Halim

Comprometimento fisiológico e seminal de cães machos infectados experimentalmente por *leptospira interrogans* sorovar

Canicola / Halim Atique Netto. – – Jaboticabal, 2008

xxi, 85 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Raul José Silva Gírio

Banca examinadora: Vicente Borelli, Silvio Arruda Vasconcellos, Luís Antônio Mathias, Samir Issa Samara

Bibliografia

1. Leptospira. 2. Cães. 3. Reprodução. 4 Sêmen. 5 Urina. 6 PCR.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.986.7:636.7

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

Halim Atique Netto – nascido em 28 de janeiro de 1978, em São José do Rio Preto, São Paulo, filho de Andraci Lucas Veltroni Atique e Halim Atique Júnior; é graduado na primeira turma do Curso de Medicina Veterinária da UNIRP - Centro Universitario de Rio Preto em dezembro de 2000 e está inscrito no CRMV-SP - Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo desde o mesmo ano. Ingressou no curso de Mestrado em medicina veterinária, área de concentração reprodução animal na FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal em março de 2001, e o concluiu em maio de 2003. Iniciou a docência em agosto de 2001, nas disciplinas de reprodução animal e obstetrícia veterinária no Curso de Medicina Veterinária da UNIRP, até os dias atuais. É veterinário credenciado para os exames de brucelose e tuberculose e responsável técnico do laboratório de anemia infecciosa eqüina pelo MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, no Hospital Veterinário da UNIRP desde 2004, onde também é diretor a partir do mesmo ano até então. Matriculo-se no curso de Doutorado em medicina veterinária, área de concentração medicina veterinária preventiva na FCAV / UNESP – Jaboticabal em março de 2005 até sua conclusão em novembro de 2008.

*“O Senhor Deus te porá por cabeça, e não por cauda;
e só estarás em cima, e não debaixo, se seculares os
Seus mandamentos”.*

Deuteronômio, 28:13

Dedico

*À minha esposa, Táбата, e à minha filhinha Najla,
que me ajudaram e entenderam nos momentos de trabalho
e de estudo, nas quais eu renovava sempre minhas forças.
O céu e o sol de todos os meus dias!*

Amo Vocês demais!!!

Ofereço

A todos os animais que contribuíram para que este trabalho se realizasse, possibilitando o avanço da ciência, em benefício deles próprio e de nós, seus irmãos maiores.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Raul José Silva Girio, que com brilhantismo me orientou neste trabalho como aluno, como pessoa, sendo um mentor, mostrando-me todas as faces de um verdadeiro educador. Muito obrigado por tudo!

Ao Professor Doutor Vicente Borelli, que mais uma vez esteve presente nesta etapa da minha formação, sempre como mestre e amigo.

À Doutora Fernanda Senter Magajevski, uma super-amiga e auxiliadora, que sempre pôde me estender a mão, principalmente para o que eu não dominava, com paciência e dedicação de uma mestra pra mim.

À Professora Tábata Salum Calille Atique, que comandou o Hospital Veterinário da UNIRP em minhas ausências, sempre com competência e doçura, me surpreendendo sempre!

Ao Professor Doutor Alan Perez Ferras de Melo, pelo companheirismo e pela amizade, que me permitiram terminar outrora a monografia, posteriormente a dissertação e esta tese, sendo meu professor de graduação, meu coordenador e meu irmão. Muito obrigado!

Ao Professor Rodolfo Bilachi Prado, que com muita dedicação e empenho esteve á frente do laboratório FertVitro - UNIRP, atento a tudo e a todos, se desdobrando comercialmente e tecnicamente, exemplo que o discípulo supera o mestre. Valeu!

Ao Professor Doutor Leonardo José Richtzenhain, do laboratório de biologia molecular e sorologia aplicada da FMVZ/USP, pelo apoio e auxílio na execução dos exames de DNA de nosso trabalho.

Ao Professor Doutor Sílvio Arruda Vasconcellos, do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP pelo fornecimento das cepas de leptospiros utilizadas nos exames de sorologia do laboratório de leptospirose e brucelose da FCAV-UNESP, os quais compuseram nosso trabalho.

Aos Professores Rodrigo Storti, Camila Ruiz, Tatiana Cruvinel; e às técnicas Cleide Momesso e Edna Marthins, do laboratório de análises clínicas e infecciosas do Hospital Veterinário da UNIRP, por me auxiliarem na execução dos exames clínicos do experimento, e me mostrarem que sempre podemos contar com gente competente e dedicada.

À Professora Carla Dan De Nardo, ao enfermeiro Daniel De Nardo e ao biólogo Fabiano, do Biotério do Hospital Veterinário da UNIRP, que me ajudaram a promover a colheita das amostras dos cães do experimento, sempre com alegria, descontração e destreza, por mais que a situação fosse triste.

Aos Professores Doutor Daniel Bártoli de Sousa e Maurício Barros Fernandes, que, com companheirismo e amizade, foram pacientes e complacentes comigo, assumindo as aulas de reprodução e obstetrícia em várias ocasiões em que eu estava no curso de doutorado. Muito obrigado!

A todo o corpo funcional da biblioteca da UNESP de Jaboticabal, que sempre esteve pronto a solucionar as buscas por referência e conhecimento desse período, em especial a bibliotecária Tieko, que na reta final do trabalho me mostrou que formatação e normas técnicas são ciência!

À tia Fauzia Atique e aos primos Márcia, Mirian, Marta, Fernando, Evandro, Eduardo e Samuel, pela recepção calorosa e sincera, e por dividirem comigo não só uma casa, mas uma família, durante o mestrado e agora o doutorado, relevando meus abusos e contratempos. Muito Obrigado!

Aos meus pais, Halim Atique Júnior e Andraci Lucas Veltro Atique, por acreditarem mais uma vez em mim e proporcionarem mais esta qualificação profissional, e meus irmão Henry, Andraci Maria e Haline, que sempre vibraram com as minhas conquistas, e agora estão “babando” na sobrinha Najla!

À minha avó Yolanda Lucas Veltroni, que, com ternura e “açúcar” próprios de vó, sempre se alegrando comigo, demonstrou um amor, que eu só vejo maior com a bisneta; e aos saudosos Avós Olinto Veltro, Halim e Yvette Atique, e às tias Alice e Violete, que, mesmo por pouco tempo, marcaram minha vida. Sinto Saudades.

Aos tios Anete, Ronei, Ariádine, Alexandre, Adi, Rutý, Maria Lúcia, Edmo, Neide e Wilma; por serem a estrutura e a base que todo mundo precisa ter, FAMÍLIA!

Aos amigos de pós-graduação Lucas e Michele, que dividiram comigo os afazeres do curso e do projeto, possibilitando a realização deste trabalho a várias mãos, não havendo possibilidade de estarmos separados. Muito obrigado!

Aos professores, técnicos, funcionários e amigos do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV-UNESP, por serem pessoas boníssimas e agradáveis, além de competentes e sinceras, em especial, Prof. Samir e Prof. Mathias, que também contribuíram para esta tese; Prof. Adjair, Prof. Nader, Profa. Ângela, Profa. Adolorata, Profa. Glorinha, Prof. Amaral; e Assis, Diba, Marisa, Andréa, José Tebaldi, Hermes e Lila. Obrigado por tudo!

Aos professores, funcionários, técnicos e amigos do Hospital Veterinário da UNIRP, por se empenharem em levar nosso hospital sempre avante e com muita qualidade, mesmo que de vez em quando sem timoneiro, muito obrigado!

Aos meus queridos alunos de reprodução animal e obstetrícia veterinária, que, sempre compreenderam as minhas falhas e contratempos, e lidaram com a minha pouca atenção neste período de busca do conhecimento, sabendo que era por uma causa nobre, a própria docência. Minhas sinceras desculpas e meus agradecimentos.

Ao Professor Doutor Antonio Carlos Alessi, e as técnicas Maria Inês e Francisca, do laboratório de histologia do departamento de patologia veterinária da FCAV-UNESP, pelo auxílio na confecção das lâminas de levaditi e histologia do nosso estudo.

Ao Professor Doutor Áureo Evangelista Santana e seu técnico Eugênio, do laboratório de análises clínicas do departamento de clínica e cirurgia veterinária da FCAV-UNESP, pela ajuda na confecção das fotos das lâminas de Levaditi e Histologia de nosso trabalho.

O agradecimento maior a DEUS, por nunca me deixar e sempre existir na minha vida, no meu coração e em tudo que eu faço, permitindo que eu corra a carreira e me ajudando a guardar a fé. Graças a ELE, por tudo que sou! Louvado seja o nome do SENHOR!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xix
RESUMO.....	xx
SUMMARY.....	xxi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	01
2. JUSTIFICATIVAS.....	11
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 - Instalação e manejo dos cães.....	12
4.2. Seleção dos animais.....	12
4.3 – Inoculação.....	13
4.4. Colheita de amostras.....	14
4.4.1. Sangue.....	14
4.4.2. Sêmen.....	14
4.4.3. Urina.....	14
4.5 – Eutanásia dos animais.....	14
4.6– Pesquisa de anticorpos.....	15
4.6.1– Preparo dos antígenos de leptospira.....	15
4.6.2 – Técnica de soraglutinação microscópica	15
4.7 – Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	17
4.7.1 – Extração de DNA.....	17
4.7.2 – Oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	19
4.7.3 - Amplificação do DNA bacteriano.....	20
4.7.4 – Ciclo de amplificação.....	20
4.7.5 – Análise do produto amplificado.....	21
4.7.6 – Amostra de sêmen canino para contaminação experimental.....	21
4.7.7 – Determinação do limiar de detecção da técnica de PCR na amostra de sêmen canino experimentalmente contaminado com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola.....	22
4.8 – Análises dos ejaculados.....	22
4.8.1. Análises macroscópicas.....	22
4.8.1.1. Volume.....	22
4.8.1.2. Coloração.....	23
4.8.2. Análises microscópicas.....	23
4.8.2.1. Motilidade espermática.....	23
4.8.2.2. Vigor.....	23
4.8.2.3. Concentração espermática.....	23
4.8.2.4. Turbilhonamento.....	24
4.8.2.5. Análise das morfopatologias espermáticas.....	24
4.9 – Técnica de Levaditi.....	25
4.10 – Histopatológico.....	26
4.11 – Hemograma, análise bioquímica do sangue e análise físico-química da urina.....	26

4.12 – Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO 1.....	76
ANEXO 2.....	78

LISTA DE TABELAS

1. Títulos de anticorpos aglutinantes 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 G1 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 28

2. Títulos de anticorpos aglutinantes 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 G2 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 29

3. Títulos de anticorpos aglutinantes 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 G3 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 30

4. Títulos de anticorpos aglutinantes 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 G4 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 30

5. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento, da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozóides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante quatro avaliações num período de 7 dias, representando o Grupo G1 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 32

6. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento, da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozóides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o Grupo G2 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 33

7. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento, 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 G3 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 34

8. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento, 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 G4 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 35

9. Média aritmética, expressa em porcentagem, dos defeitos maiores, menores, totais e de cabeça isolada 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..... 37

10. Média aritmética dos defeitos maiores, menores, totais e de cabeça isolada 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..... 38

11. Média aritmética dos defeitos maiores, menores, totais e de cabeça isolada 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..... 39

12. Média aritmética dos defeitos maiores, menores, totais e de cabeça isolada 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..... 40

13. Resultado da PCR para amostras de sêmen e urina 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 G1 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 42

14. Resultado da PCR para amostras de sêmen e urina 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 G2 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 42

15. Resultado da PCR para amostras de sêmen e urina 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 G3 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 44

16. Resultado da PCR para amostras de sêmen e urina 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 G4 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 45

17. Média aritmética do número de hemácias, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, plaquetas e da concentração de uréia, fosfatase alcalina, albumina e cálcio 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..... 52

18. Média aritmética do número de hemácias, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, plaquetas e da concentração de uréia, fosfatase alcalina, albumina e cálcio 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..... 53

19. Média aritmética do número de hemácias, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, plaquetas e da concentração de uréia, fosfatase alcalina, albumina e cálcio 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..... 55

20. Média aritmética do número de hemácias, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, plaquetas e da concentração de uréia, fosfatase alcalina, albumina e cálcio 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..... 56

21. Média aritmética da temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa (Kg) 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..... 57

22. Média aritmética da temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa (Kg) 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..... 58

23. Média aritmética da temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa (Kg) 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..... 58

24. Média aritmética da temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa (Kg) 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..... 59

LISTA DE FIGURAS

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 pb; 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..... 47
2. Resultado da PCR para amostra de sêmen do cão G4A2 (Grupo quatro animal infectado dois). L) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 pb; 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..... 47
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 leptospiros por mL; 2) Sêmen com 10^7 leptospiros por mL; 3) Sêmen com 10^6 leptospiros por mL; 4) Sêmen com 10^5 leptospiros por mL; 5) Sêmen com 10^4 leptospiros por mL; 6) Sêmen com 10^3 leptospiros por mL; 7) Sêmen com 10^2 leptospiros por mL; 8) Sêmen com 10^1 leptospiros por mL; 9) Sêmen com 10^0 leptospiros por mL; 10) controle negativo da PCR. Jaboticabal, São Paulo, 2007..... 48
4. Fotomicrografia de corte histológico da próstata do animal infectado G4A3, utilizando a técnica de coloração Hematoxilina e Eosina, mostrando a presença de prostatite, evidenciada através de células de inflamação infiltrativas. Aumento de 100x..... 49
5. Fotomicrografia de corte histológico do fígado de animal infectado utilizando a técnica de coloração Levaditi, mostrando a presença de leptospira. Aumentom de 400x..... 50

**COMPROMETIMENTO FISIOLÓGICO E SEMINAL DE CÃES MACHOS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Leptospira interrogans*
SOROVAR CANICOLA**

Resumo

O trabalho presente objetivou pesquisar a presença de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola em 32 cães, dos quais 20 infectados e 12 controle, em 4 grupos de estudo com 5 infectados e 3 de controle. No G1 os animais foram eutanasiados 7 dias após a inoculação, no G2, 15 dias, no G3, 30 dias e no G4 45 dias. Colheu-se sêmen, urina e sangue nos dias 0, 3, 5, 7, 10 e após, a cada 5 dias, com realização de exames andrológicos do sêmen e bioquímicos da urina e do sangue, e reação em cadeia da polimerase (PCR) dessas amostras. Avaliou-se o estado clínico, e o soro sanguíneo foi submetido à soro-aglutinação microscópica (SAM). Os títulos sorológicos dos infectados chegaram a 2.560. Na PCR, detectou-se DNA de leptospiros primeiro no sêmen e depois na urina, e não se detectou nos testículos, epidídimos, próstata, rins e fígado. Na Levaditi, foi encontrada leptospira em um fígado, e no histopatológico, 5 animais com prostatite, evidenciada também pelo aumento do número de espermatozóides com a patologia cabeça isolada. O exame andrológico mostrou declínio na motilidade, no vigor, na concentração espermática e defeitos maiores acima de 10%. No hemograma, observou-se alterações a partir do dia 3 pós-infecção, e ao exame bioquímico a partir do dia 30, indicando possíveis alterações hepáticas e renais. Conclui-se que cães infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola apresentam queda na qualidade espermática, sendo importantes fontes de infecção para o homem e animais, podendo inclusive transmitir a leptospirose por meio de sêmen nos primeiros dias pós-infecção, antes da transmissão urinária, sendo detectada pela PCR anteriormente a SAM.

Palavras chave: *Leptospira*, cães, reprodução, sêmen, urina, PCR

**PHYSIOLOGY AND SEMINAL COMMITMENT OF MALES DOGS
EXPERIMENTALLY INFECTED BY *Leptospira Interrogans*
SEROVAR CANIOLA**

Summary

The present study aimed to investigate the presence of *Leptospira interrogans* serovar Canicola. in 32 dogs, of which 20 are infected and 12 control, 4 study groups with 5 infected and 3 of control. In G1 animals were euthanasing 7 days after inoculation, the G2, 15 days, the G3, 30 days in the G4 and 45 days. It is collected semen, urine and blood on days 0, 3, 5, 7, 10 and after, every 5 days, with laboratory tests of semen andrological and biochemical of urine and blood, and polymerase chain reaction (PCR) Of these samples. Evaluated the clinical status, and serum was submitted to serum-microscopic agglutination (SAM). The serological evidence of infection arrived in 2560. In PCR, DNA was found in semen of leptospires first and then in the urine, and is not detected in testis, epididymis, prostate, kidney and liver. In Levaditi, was found leptospira in a liver, and the histopathology, 5 animals with prostatitis, evidenced also by increasing the number of sperm with the pathology head alone. The examination showed andrologic decline in motility, in effect, defects in sperm concentration and higher above 10%. In the blood, it was observed changes from day 3 post-infection, and the biochemical examination on the day 30, indicating possible kidney and liver abnormalities. It follows that dogs infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola present decrease in sperm quality, and important sources of infection for humans and animals, which may include forward to leptospirosis through semen during the first day post-infection, before urinary transmission, and PCR detected earlier by the SAM.

Key words: *Leptospira*, dogs, reproduction, semen, urine, PCR

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

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

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 leptospirosas ou na presença de anticorpos específicos induzidos pelo agente (VASCONCELLOS, 2000).

As leptospiroses apresentam forte significado sócio-econômico-cultural e são exacerbadas 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 a expansão de roedores (MAGALHÃES et al., 2006).

As leptospirosas são espiroquetas pertencentes à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (NOGUCHI, 1918). O gênero *Leptospira* era anteriormente dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, apresentando uma variação antigênica caracterizada por 23 sorogrupos e 202 sorotipos (BARATON e POSTIC, 1989), que englobava um grande número de variedades antigênicas, e *Leptospira biflexa*, variedades de comportamento saprófita 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 leptospirosas patogênicas e saprófitas. A identificação dos sorotipos só era possível pelo emprego da técnica de absorção cruzada de aglutininas, executada por laboratórios de referência (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985). Em 1992, o Subcomitê de Taxonomia da *Leptospira* propôs uma nova divisão para o gênero, o qual é formado

atualmente por oito genomoespécies patogênicas: *L. borgptersenii*, *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: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, 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 uma 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 Wolffi 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; JORGE, 2008).

Durante o período de incubação, de sete a 14 dias, ocorre a septicemia, surgindo a produção de anticorpos da classe IgM, que tem uma atividade de poucos dias, e surgem mais tardiamente anticorpos da classe IgG. Apesar dos anticorpos ajudarem 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 meio da urina por períodos de tempo variados, caracterizando a fase de leptospirúria; com isso os animais tornam-se uma fonte de infecção importante, denominada portador renal (VASCONCELLOS, 1987; SILVEIRA, 1996).

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 leptospirose em bovinos pode persistir entre dez dias e quatro meses, tendo caráter intermitente. Nos carnívoros, devido ao elevado pH da urina, as leptospirosas não sobrevivem por um longo período, mas, com a utilização de rações comerciais, a urina dos cães se torna uma importante via de transmissão (ACHA e SZYFRES, 1986). Originalmente, os carnívoros não representavam uma fonte de infecção muito séria para o homem, uma vez que, devido à sua alimentação à base de carnes, o pH da urina é mais ácido, o que representa um ambiente inóspito para as leptospirosas, mas no caso dos cães domésticos, alimentados com rações comerciais, o pH da urina torna-se apropriado para a manutenção e sobrevivência dessas bactérias. Em cães, a leptospirose está normalmente relacionada com nefrite intersticial, e como consequência dos danos renais normalmente se observa proteinúria (ZARAGOZA et al., 2003). Em ambiente urbano, devido ao contato muito próximo estabelecido entre cães e humanos, é considerado que a principal fonte de infecção da leptospirose humana são os cães. Esses animais vivem em contato direto com os seres humanos e podem eliminar leptospirosas vivas pela urina durante meses, mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico (FAINE et al., 1999). 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). Os roedores são um importante reservatório da doença e fonte de infecção para os cães, o que torna difícil sua erradicação na população canina (DUTTA e CHRISTOPHER, 2005; PERRET et al., 2005).

Um estudo publicado na revista *The Canadian Veterinary Journal* em 2002 mostra um aumento acentuado no número de casos de leptospirose canina a

partir do ano de 1998 no Hospital Escola da Faculdade de Veterinária de Ontário (PRESCOTT et al., 2002).

Vários inquéritos sorológicos realizados em cães no Brasil retrataram a variabilidade da distribuição de sorovares de *Leptospira* spp. predominantes nas diferentes localidades. FURTADO et al. (1997) examinaram 260 cães em Pelotas, RS, e encontraram prevalência de 28,9%, com destaque para os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. ÁVILA et al. (1998) encontraram 34,8% de reatores em 425 cães de Pelotas, RS, com predomínio dos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. JOUGLARD e BROD (2000), em Pelotas, 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 15,0% 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 a prevalência de leptospirose foi 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, encontrando 13,1% de positividade, sendo as sorovariedades Canicola, Ballum, Pyrogenes e Icterohaemorrhagiae as mais prevalentes.

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

O diagnóstico definitivo da infecção por *Leptospira* spp é usualmente dado pelo isolamento e cultivo do agente, entretanto esse procedimento é oneroso,

necessita de amostras recém-colhidas, e pelo menos 30 dias são requeridos para a obtenção de resultados conclusivos (BOLIN et al., 1989).

Nos últimos anos, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se importante 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; MASRI et al., 1997). KEE et al. (1994) puderam detectar *L. interrogans* no sangue de Sagüis (*Merionis unguiculatus*) dois dias após a infecção experimental, enquanto anticorpos só foram detectados pela SAM sete dias pós-infecção.

MÉRIEN et al. (1992) sintetizaram o par de oligonucleotídeos iniciadores 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, revelou ser específica para *Leptospira spp*, não amplificando o DNA de outras bactérias como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia hermsii*, *Treponema denticola*, *Treponema pallidum*, entre outras.

Mais tarde, novos oligonucleotídeos iniciadores (primers) foram desenvolvidos a partir de DNA de outros sorovares, como Icterohamorrhagiae e Bim, estes capazes de detectar apenas leptospiros patogênicos (GRAVEKAMP et al., 1993).

HEINEMANN (1995) demonstrou que os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados por MÉRIEN et al. (1992) foram 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 *L. biflexa* (apatogênica) ou *L. interrogans* (patogênica), devido provavelmente ao fato de os genes de rRNA serem altamente conservados entre as bactérias.

Vários autores têm descrito bons limiares de detecção de leptospiros pela técnica de PCR. HEINEMANN (1995) descreveu ter detectado 10 bactérias por mL em sêmen de touros; no entanto 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 leptospiros 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 por meio da técnica de PCR. No mesmo trabalho, os autores aplicaram uma 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 leptospiros 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.

Muitos estudiosos têm utilizado a PCR no diagnóstico da leptospirose canina a partir da urina desses animais.

CAI et al. (2002) utilizaram os “primers” G1/G2 e B64-I/B64-II para detectar sorovares de leptospiros patogênicos em urina canina. Eles relataram que a prova se mostrou específica e sensível, apresentando um limiar de detecção de 100 células de leptospiros icterohaemorrhagiae por mililitro de urina.

Em um estudo com 123 cães com sintomas sugestivos de leptospirose e 13 animais clinicamente saudáveis, concluiu-se que a PCR para detecção de leptospiros na urina de cães teve 100% de sensibilidade e 88,3% de especificidade, sendo considerada uma arma 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 leptospiros patogênicas na urina, representando um risco para seus proprietários. Eles também concluíram que o teste sorológico é um indicativo pobre, em termos de diagnóstico precoce, da eliminação de leptospiros pela urina.

Uma das características da infecção por leptospiros que há muito tempo é conhecida é a sua importância como enfermidade bovina que interfere na qualidade reprodutiva desses animais. 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 relação anatômica dos aparelhos urinário e genital dos machos, em que a uretra é o ducto excretor comum para urina e sêmen, favorece a contaminação do sêmen por leptospiros enquanto o animal se apresenta em fase de leptospirúria.

Uma das primeiras comprovações sobre a 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. 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. A necropsia de três machos revelou a presença de inflamação dos testículos e das glândulas anexas.

MAGAJEVSKI et al. (2004) estudaram as possíveis alterações nos padrões analisados em exames andrológicos de touros e constataram que os bovinos podem ter uma queda na qualidade do ejaculado quando expostos a uma infecção por leptospiros.

Apesar do crescente interesse na reprodução assistida em cães, existem poucas informações científicas sobre a fisiologia da reprodução nesta espécie, em

comparação a outras. E ainda menos informações sobre as múltiplas causas de infertilidade em cães machos, inclusive com informações sobre quais as possíveis doenças que poderiam ser transmitidas durante a reprodução.

O aumento do número e da 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 do sêmen de cães é branco-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 1mL até mais de 80mL 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., 2001). 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 os cães maiores produzem mais espermatozóides 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 azospermia, 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 morfolologicamente normais (MEYERS-WALLEN, 1991). Motilidade e morfologia espermática anormais, com frequência, são os primeiros indicadores 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).

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

Utilizando a técnica de Levaditi, KANEKO e OKUDA (1917) conseguiram demonstrar a presença de leptospirosas em mais de 50% dos tecidos hepáticos de 43 casos clínicos de leptospirose humana. Nos fragmentos de rins examinados, verificaram a presença do agente; nos primeiros dias, as leptospirosas estavam localizadas no interstício, e mais tardiamente, no espaço intracelular.

ZAMORA (1995) encontrou, por meio das técnicas de Levaditi, observação direta em campo escuro, imunofluorescência e imunoistoquímica, a presença de leptospirosas 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 leptospirosas 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.

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), utilizando as técnicas de Levaditi e imunoistoquímica, observaram a presença de *L. interrogans* sorovar Pomona no testículo, no epidídimo, na vesícula seminal, no rim e no fígado de hamsters experimentalmente infectados.

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm se dedicado a estudar a presença das leptospiros nos tecidos, com o objetivo de detectar a possível existência desse microrganismo em estruturas do aparelho reprodutor tanto das fêmeas como dos machos. A melhor compreensão da patogenia da leptospirose poderia ajudar no desenvolvimento de métodos mais eficientes de controle sanitário (MARPLETOFT, 1986).

2- JUSTIFICATIVAS

A realização deste trabalho é justificada pela inexistência de artigos relatando o comprometimento do aparelho reprodutor de cães em infecções por leptospiros aliada à crescente utilização de técnicas de reprodução assistida nessa espécie.

3- OBJETIVOS

O presente projeto tem por objetivos:

- pesquisar a presença de leptospiros em sêmen e urina de cães infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola;
- avaliar o perfil andrológico desses animais comparando-o ao de animais não infectados;
- pesquisar a presença de leptospiros nos testículos, no epidídimo e na próstata, bem como avaliar a extensão das lesões provocadas por esses patógenos em animais experimentalmente infectados;
- comparar os achados com exames clínicos/laboratoriais complementares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Instalação e manejo dos cães

Os cães 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”.

4.2 - Seleção dos animais

Foram selecionados cães machos em idade reprodutiva (entre 1 e 4 anos), sem raça definida, com massa corpórea variando de 10 a 15 kg, recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses do Município de São José do Rio Preto, que não apresentaram título de anticorpos séricos contra os sorovares de *Leptospira* spp (Quadro 1), por meio da prova de soroaglutinação microscópica (SAM), em dois testes realizados no intervalo de sete dias, e com a reação em cadeia da polimerase (PCR) na urina negativa nessas duas ocasiões, descartando a possibilidade dos animais serem portadores renais (FAINE, 1982).

Foram utilizados 32 animais, dos quais 20 foram inoculados com a cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola (LO4) e 12 receberam solução fisiológica, sendo considerados como grupo-controle e tratados da mesma forma que o grupo infectado. Esses animais foram divididos em quatro grupos de estudo, todos compostos de cinco cães infectados com a cepa patogênica LO4, e três animais de controle; os animais do grupo 1 (G1) foram eutanasiados após sete dias da inoculação, os animais do grupo 2 (G2) foram eutanasiados 15 dias após a inoculação, os animais do grupo 3 (G3) eutanasiados após 30 dias de incubação e os animais do grupo 4 (G4) foram eutanasiados após 45 dias da inoculação da cepa patogênica.

Nos dias zero (dia da inoculação), três, cinco, sete, 10 e a partir daí de cinco em cinco dias após a inoculação da cepa patogênica de *Leptospira*, foram colhidas amostras de sangue, sêmen e urina. No sêmen foram realizados exames andrológicos, no sangue, além da SAM (para traçar a curva de títulos) e de um hemograma completo, foram verificados os níveis de uréia, creatinina, fosfatase alcalina, transaminase, albumina, ALT, colesterol, glicose e cálcio. Na urina, foram realizados os testes biofísicos e bioquímicos e observação quanto a proteinúria e cilindros granulosos, inclusive no dia da eutanásia.

Nos dias de colheita dos materiais, foi realizada paralelamente uma avaliação clínica dos cães, tanto os inoculados quanto os de controles, observando-se principalmente se havia uremia, hemoglobinúria, icterícia, glossite ou estomatite, temperatura dos animais, peso corporal, frequência cardíaca e frequência respiratória. Foram colhidas na necropsia, amostras de rim, fígado, epidídimo, testículo e próstata para realização de PCR, e das técnicas de coloração de Levaditi e histopatológico.

4.3 - Inoculação*

Foi utilizado um inóculo com a cepa virulenta do sorovar Canicola da estirpe LO4 (FREITAS et al., 2004) na concentração de 10^9 leptospiras por mL. Para obter essas concentrações de leptospiras, as mesmas foram contadas em lâminas microscópicas 24 x 76 mm, (FAINE, 1982). Foram inoculados quatro mililitros do inóculo por via subcutânea na região cervicodorsal.

*Cepa LO4 - cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, isolada de fígado de suíno, pela equipe do Prof. Dr. Julio César de Freitas, em estudo realizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL) gentilmente cedida pelo Instituto Biológico de São Paulo.

4.4- Colheita das amostras

4.4.1 - Sangue

A colheita de sangue foi realizada por venopunção, parte do sangue foi utilizada imediatamente na análise laboratorial com a adição de anti-coagulante, e parte foi dessorada após retração do coágulo. O soro foi então identificado e encaminhado para o exame sorológico, realizado pela técnica de SAM, a fim de estabelecer uma curva de títulos nos animais.

4.4.2 - Sêmen

Para a colheita do sêmen foi aplicada a técnica de estimulação manual peniana (JOHNSTON et al., 2001). Em parte das amostras da primeira e segunda fração do ejaculado, foram realizados o espermograma e a avaliação morfológica, e outra parte das amostras foi congelada à temperatura de -20° C até o momento do exame de PCR.

4.4.3 - Urina

A colheita da urina foi realizada com a utilização de sonda. Parte das amostras foi utilizada na análise físico-química e outra parte das amostras foi congelada à temperatura de -20° C até o momento do exame de PCR.

4.5 – Eutanásia dos animais

Os animais foram inicialmente sedados com acepromazina na dose de 0,01mg/kg via intravenosa e em seguida, pela mesma via, receberam overdose de tionembutal na dose de 25mg/kg (dose normal 12,5mg/kg) e brometo de pancurônio na dose de 0,11mg/kg I.V. até total parada cardiorrespiratória.

4.6 - Pesquisa de anticorpos*

4.6.1 - Preparo dos antígenos de leptospira

Os sorovares de leptospira utilizados como antígenos foram provenientes de matrizes repicadas semanalmente em meio de cultura EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris, Difco) enriquecido com soro sanguíneo de coelho, na proporção de 10%, e mantidos em estufa bacteriológica (B.O.D.) a 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 e JONES (1980).

4.6.2 - 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 colocadas alíquotas de 50 µL e adicionada igual quantidade de antígeno, resultando na diluição de 1/10. A mistura soro-antígeno foi levemente agitada e incubada em estufa bacteriológica B.O.D. a 28° C por duas horas, procedendo-se a seguir à leitura. O critério adotado para considerar um soro como reagente foi o de 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospiras aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. O título do soro foi considerado a recíproca da sua maior diluição que apresentou 50% de aglutinação.

* Realizado no Laboratório de Leptospirose e Brucelose da FCAV/UNESP sob a supervisão do Prof. Dr. Raul José Silva Girio.

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 a variante sorológica.

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
3	<i>Ballum</i>	Castellonis
4	<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>Panama</i>	Panama
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

* Ceadas gentilmente pelo Prof. Dr. Sílvia Arruda Vasconcellos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP.

4.7 – Reação em cadeia pela polimerase (PCR)*

4.7.1 - Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras clínicas de sêmen e de urina, utilizou-se a técnica com isotiocianato de guanidina (adaptado de CHOMCZYNSKI, 1993). A reação foi realizada em microtubos de 1.500µL, de acordo com a sequência de etapas que se seguem

- Adição de 600µL de isotiocianato de guanidina.
- Adição de 200µL de sêmen.
- Homogeneização por 10 segundos em agitador orbital (Vórtex).
- Incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugação rápida.
- Adição de 100µL 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 400µL da fase aquosa para novo tubo de 1.500µL, tomando o cuidado de não aspirar a interface orgânica.
- Realização da precipitação acrescentando 600µL 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 500µL de etanol a 70%.
- Centrifugação a 14.000 x g/15min.
- Desprezo do sobrenadante por inversão.

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

- Banho-maria a 56°C por 15 minutos.
- Suspensão do sedimento com 30µL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0).
- Banho-maria a 56°C por 30 minutos.
- Estocagem a -20° C, ou utilização imediata para amplificação.

Para a extração de DNA das amostras dos órgãos (rim, fígado, epidídimo, testículo e próstata), foi utilizada a técnica com lise enzimática com proteinase K (SAMBROOK et al., 1989). A reação foi realizada em microtubos de 1.500µL, de acordo com a seqüência de etapas que se seguem

- Adição de 300µL da amostra clínica.
- Adição de 300µL de tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 (TE). (somente para as amostras de sêmen).
- Homogeneização por 10 segundos em agitador de tubos.
- Centrifugação em 13.000 x g/30 min.
- Ressuspensão do sedimento (pélete) em 300µL de tampão de lise.
- Adição de 150µL de tampão fenol.
- Homogeneização por 20 segundos em agitador de tubos
- Centrifugação da 13.000 x g/5min.
- Transferência de 200µL da fase aquosa para novo tubo de 1.500µL, tomando o cuidado de não aspirar a interface orgânica.
- Adição de 100µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção de 25/24/1.
- Homogeneização por 10 segundos em agitador de tubos.
- Centrifugação em 13.000 x g/5min.
- Transferência de 100µL da fase aquosa para novo tubo de 1.500µL, tomando o cuidado de não aspirar a interface orgânica.
- Adição de 20µL de acetato de sódio 2M.
- Adição de 240µL de etanol absoluto.

- Homogeneização por inversão.
- Manutenção em -20° C “overnight”.
- Centrifugação em 13.000 x g/15 min.
- Descarte do sobrenadante por inversão e lavagem do pélete com 500µL de etanol 70%.
- Centrifugação da 13.000 g/15 min.
- Secagem do pélete de DNA.
- Ressuspensão do pélete em 30µL de TE com pH 7,4.
- Incubação em banho-maria a 56° C/15min.
- Estocagem a -20° C, ou utilizar imediatamente para amplificação.

4.7.2 - Oligonucleotídeos iniciadores (primers) empregados na amplificação

Foram utilizados os primers descritos por MÉRIEM et al. (1992), gênero-específicos, de 330 pb

Quadro 2 Sequência dos pares de base dos dois primers utilizados no experimento.

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

4.7.3 - Amplificação do DNA bacteriano

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

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

4.7.4 - Ciclo de amplificação

Foi utilizado o ciclo de amplificação 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

4.7.5 - 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 tampão de corrida TBE 0,5 X (0,04M tris-acetato e 0,001M EDTA, pH 8,0), segundo SAMBROOK et al. (1989), como segue.

A cada uma das cavidades do gel foram adicionados 12µL de uma mistura contendo 10µL de produto amplificado e 2µL 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 5µg 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.

4.7.6 - 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 negativa para a técnica de PCR utilizada.

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

Foi empregada uma suspensão bacteriana 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), esta suspensão bacteriana revelou conter $3,6 \times 10^8$ bactérias/mL. A fim de avaliar a menor concentração de DNA bacteriano que a técnica de PCR pôde detectar em sêmen canino, o sêmen descrito no item 4.7.6 foi contaminado experimentalmente com diferentes concentrações da 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 .

4.8 – Análises dos ejaculados*

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

4.8.1 - Análises macroscópicas

4.8.1.1 - Volume

O volume da primeira e da segunda fração do ejaculado foi medido no próprio tubo graduado no qual foi feita a coleta.

* Realizado no momento da colheita no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário da UNIRP.

4.8.1.2 - Coloração

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

4.8.2 - Análises microscópicas

4.8.2.1 - 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.

4.8.2.2 - Vigor

Utilizando-se das 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).

4.8.2.3 - Concentração espermática

Para determinação da concentração de espermatozóides (sptz/mL), foi utilizada diluição de 1/20, sendo 50µL do ejaculado em 950µL de água destilada. A partir da referida diluição, preencheram-se as duas hemícâmaras 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.

4.8.2.4 - 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 em uma escala de zero a cinco.

4.8.2.5 - Análise das morfolopatologias espermáticas

A morfologia dos espermatozóides foi avaliada por exame de amostras do ejaculado em lâminas, no aumento de 100X (óleo de imersão), e foram contadas 200 células de cada amostra. A técnica utilizada para confecção das lâminas foi a preconizada por JOHNSTON et al., 2001. Foi feito um esfregaço de uma gota de sêmen, corado com Wright-Giensa. Os números e os tipos de anormalidades foram anotados, e a porcentagem determinada. Quando um espermatozóide apresentava mais de uma anormalidade, era anotada apenas a considerada mais séria (SEAGER, 1986). As anormalidades foram consideradas como defeitos maiores (cabeça: subdesenvolvida, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal, contorno anormal, “pouch formation”, acrossomo, gota citoplasmática proximal, forma teratológica; peça intermediária; cauda: dobrada ou em gota, enroladas na cabeça e formas duplas) e defeitos menores (cabeça: delgada, gigante-pequena-anormal, isolada anormal; cauda e implantação: retro-abaxial-oblínquo, dobrada ou enrolada e com gota citoplasmática distal).

Foram consideradas como amostras de sêmen normais as que tiveram menos que 10% de defeitos maiores, menos de 20% de defeitos menores e defeitos totais entre 20 e 30% (JOHNSTON et al., 2001).

4.9 - Técnica de Levaditi

Essa técnica foi realizada conforme o procedimento descrito por Mc MANUS e MOWRY (1965)

- Os fragmentos de tecidos foram 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 (Anexo 1).
- Bloqueio da reação em solução redutora, por 24 a 72 horas à temperatura de 37°C, no escuro (Anexo 1).
- 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 micrometro (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.

4.10 - Histopatológico

Fragmentos dos testículos, epidídimos, próstata, rim e fígado foram fixados em solução neutra de formol a 10%, incluídos em parafina e cortados a cinco micrômetros de espessura para então serem corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

4.11 - Hemograma, análise bioquímica do sangue e análise físico-química da urina

A metodologia utilizada para esta análise encontra-se no final deste trabalho como anexo, uma vez que, para a maioria dos parâmetros, foram utilizados Kits comerciais.

4.12 – Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se 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, consideram-se os níveis de significância de 1% e 5% para todas as condições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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.

Como esperado, nenhum animal do grupo-controle apresentou aglutinação frente à reação de soroaglutinação microscópica (SAM) para os 24 sorovares de *Leptospira* spp. utilizados (Quadro 1), a partir da diluição 1/10; e os demais animais só apresentaram reação ao sorovar Canicola após a infecção experimental, o que comprova a qualidade das medidas adotadas no ambiente em relação às instalações e ao manejo sanitário.

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.

Podem-se observar na Tabela 1 os títulos de anticorpos antileptospira dos cães que constituíram o grupo 1 (G1) do experimento e que permaneceram infectados durante sete dias. Dos cinco cães, apenas um (G1A1) não apresentou título no período analisado, o que pode ser explicado pelos dados obtidos por REBHUN (1995), que relata que o período de incubação da leptospirose pode ser de até quatorze dias, período em que ocorre septicemia e o início da produção de

anticorpos. 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 2 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.

Tabela 1. Títulos de anticorpos aglutinantes 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 G1 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em 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 aglutinantes 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 G2 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em 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

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 grupo 4 (G4), no qual os cães infectados foram observados por quarenta e cinco dias. No grupo 4 (G4), em todos os animais foi possível a detecção de anticorpos, com títulos que variaram de 20 a 2.560, revelando que houve soroconversão em todos os animais inoculados.

Tabela 3. Títulos de anticorpos aglutinantes 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 G3 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em 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 aglutinantes 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 G4 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em 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

Uma das principais preocupações deste trabalho foi avaliar a qualidade do sêmen dos cães experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola em relação àquela apresentada pelos animais utilizados como controle.

A coloração do ejaculado dos cães infectados e de controle nos quatro grupos experimentais variou de branco-opalescente a branco-leitosa durante o período de estudo, o que é considerada a coloração esperada para esse material. O volume do ejaculado variou de 0,5 a 7 mL, valores normais e esperados de

acordo com o tamanho de cada animal. O aspecto de todos os ejaculados foi seroso, ou seja, dentro do normal (ROOT e JOHNSTON, 1994).

Nas Tabelas 5 a 8 estão apresentados os resultados dos espermiogramas dos quatro grupos experimentais, em que são comparados os valores das médias para volume, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração, de cães infectados (CI) e de controle (CC), de cada grupo, para verificar possível diferença significativa entre esses valores, durante o período experimental.

No G1, (Tabela 5) nota-se a ausência de 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 ($p < 0,05$).

Na Tabela 7, observam-se os parâmetros seminais do G3, no qual somente a concentração espermática revelou médias significativamente maiores para os CC do que dos CI nos dias sete, 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 CC do que dos CI ($p < 0,05$) no décimo quinto dia de infecção.

Tabela 5. Média aritmética e erro padrão (EP) do volume (mL), do turbilhonamento, da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante quatro avaliações num período de 7 dias, representando o Grupo G1 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros			Dias de coleta de materiais em 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, da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o Grupo G2 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros			Dias de coleta de materiais em 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, da motilidade (%), do vigor (0 a 5) e da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermáticas de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o Grupo G3 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de materiais em 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

* p < 0,05

** p < 0,01

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

Parâmetros			Dias de coleta de materiais em 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	0,3	0,2	0,3	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	0,4	0,3	0,2	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

* $p < 0,05$

Com relação aos parâmetros seminais 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 no grupo de animais infectados em três dos nove dias de colheita de material. 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 perda na qualidade do sêmen, com queda na concentração e na motilidade, diminuição do volume do ejaculado e necropermia. Porém no presente estudo não foi possível relacionar a presença de infecção com diminuição do volume do ejaculado.

A análise das características morfológicas dos ejaculados dos animais dos grupos experimentais G1, G2, G3 e G4 estão apresentadas, respectivamente, nas Tabelas 9, 10, 11 e 12, em que foram comparados os valores das médias para defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais e cabeças soltas normais, de CI e CC, de cada grupo, para verificar possível diferença significativa entre esses valores, durante o período experimental. A avaliação das cabeças soltas normais foi incluída por representarem um indicativo de prostatite (JOHNSTON et al., 2001), e essa alteração ter sido verificada nos exames macro (durante a necropsia) e microscópicos (HE) dos animais e órgãos em questão.

Observa-se, na Tabela 9, que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de cabeças isoladas entre o grupo infectado e o de controle no quinto dia pós-inoculação. Porém, mesmo com essa diferença, as porcentagens totais de defeitos maiores, menores e totais permaneceram dentro dos padrões considerados normais (JOHNSTON et al., 2001).

Tabela 9. Média aritmética, expressa em porcentagem, dos defeitos maiores, menores, totais e de cabeça isolada de cinco cães infectados (CI) e três cães de 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
Defeitos Maiores	CI	4,6	7,8	8,0	11,3
	CC	5,3	9,1	6,8	8,8
Defeitos Menores	CI	2,0	5,6	5,4	4,4
	CC	4,1	4,6	3,3	4,8
Total	CI	6,6	13,4	13,4	15,7
	CC	9,5	13,8	10,1	13,6
Cabeça Isolada	CI	0,7	1,5	1,5*	0,9
	CC	0,5	0,5	0,1	1,0

* $p < 0,05$

Para o grupo 2 (Tabela 10), foi observado que as variáveis analisadas foram significativamente superiores nos animais infectados a partir do quinto dia pós-inoculação, sendo essas diferenças significativas a 1% nos dias cinco e dez e a 5% no dia sete para a variável defeitos maiores, a 1% nos dias cinco e dez para defeitos menores, a 1% nos dias cinco e dez e a 5% nos dias sete e quinze para a variável defeitos totais e a 1% para a variável cabeça isolada normal no décimo dia pós-inoculação da cepa patogênica. Observa-se também que, a partir do dia cinco, a porcentagem de defeitos maiores ficou fora dos padrões aceitáveis.

Tabela 10. Média aritmética dos defeitos maiores, menores, totais e de cabeça isolada de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental 2 (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação					
		0	03	05	07	10	15
Defeitos Maiores	CI	10,5	8,8	12,5**	11,8*	16,6**	12,0
	CC	4,5	4,1	5,3	5,8	7,6	7,1
Defeitos Menores	CI	4,9	3,9	6,2**	4,9	8,0**	5,1
	CC	3,1	3,5	2,3	3,3	3,1	2,6
Total	CI	15,4	12,7	18,7**	16,9*	24,6**	17,1*
	CC	7,6	7,6	7,6	9,1	10,8	9,8
Cabeça Isolada	CI	1,4	0,9	1,4	0,6	3,5**	1,0
	CC	0,8	1,0	1,3	0	1,3	0,8

* p < 0,05 ** p < 0,01

Houve uma diferença significativamente superior, com probabilidade de acerto de 95%, no número de defeitos maiores entre os animais infectados e os de controle do grupo três nos dias cinco, 20, 25 e 30, e com probabilidade de acerto de 99% no dia sete. Para a variação defeitos menores, foram significativamente superiores no nível de 1% para as médias dos dias 15 e 30, e a 5% para a média do dia 25. Embora neste grupo a variável defeitos totais tenha sido significativamente maior nos animais infectados a partir do dia cinco, a porcentagem de defeitos permaneceu dentro dos padrões em todos os dias. Observou-se também que houve um maior número de espermatozóides com cabeça isolada nos animais do grupo infectado que nos do grupo de controle a partir do décimo quinto dia do experimento (Tabela 11).

Tabela 11. Média aritmética dos defeitos maiores, menores, totais e de cabeça isolada de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental 3 (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
Defeitos Maiores	CI	12,0	7,3	9,0*	10,2**	6,3	7,5	8,9*	8,8*	9,1*
	CC	6,0	5,1	5,6	6,1	5,5	6,5	5,5	6,0	5,6
Defeitos Menores	CI	4,7	3,3	4,3	4,7	3,3	7,8**	6,4	6,9*	7,5**
	CC	1,8	2,3	2,6	3,3	4,5	3,8	4,0	3,1	3,3
Total	CI	16,7	10,6	13,3*	14,9**	9,6	15,3*	15,3**	15,7**	16,6**
	CC	7,8	7,5	8,3	9,5	10,0	10,3	9,5	8,8	9,0
Cabeça Isolada	CI	1,1	0,8	0,8	1,2	0,4	2,8**	3,0*	3,4**	3,0*
	CC	1,0	1,0	0,6	1,3	1,1	0,5	1,3	0,6	1,3

* p < 0,05

** p < 0,01

No grupo de experimento 4 (Tabela 12), ocorreu uma inversão dos dados que vinham sendo obtidos e esperados, e nos animais do grupo de controle houve um maior número de defeitos, com porcentagens fora dos padrões nos animais de controle, o que pode ter ocorrido pelo fato de os animais de controle neste grupo terem apresentado problemas durante a coleta de sêmen. Porém observa-se que o número de patologias desses animais volta a um padrão estável após o trigésimo dia de experimento, ou após oito coletas. Essa volta aos padrões normais mostra que as diferenças observadas não apresentavam relação com a proposta do experimento, e esse fator inerente acabou por mascarar e até mesmo prejudicar a análise.

Tabela 12. Média aritmética dos defeitos maiores, menores, totais e de cabeça isolada de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental 4 (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
Defeitos Maiores	CI	10,4	12,2	8,1	7,0	7,3	6,4	6,7	7,9	4,7	9,5	7,7	8,0
	CC	17,6	13,3	9,8	11,6*	9,1	12,3**	10,8	12,3*	8,8	8,6	9,3	10,8
Defeitos Menores	CI	4,5	9,8	5,8	7,2	6,6	6,6	6,0	7,6	6,8	10,6	9,0	9,6
	CC	10,5	7,8	8,9	5,9	8,4	12,9**	18,9**	13,4*	7,6	9,4	9,6	8,9
Total	CI	14,9	22,0	13,9	14,2	13,9	13,0	12,7	15,5	11,5	20,1	16,7	17,6
	CC	28,1	21,1	18,7	17,5	17,5	25,2**	29,7**	25,7**	16,5	18,0	19,0	19,7
Cabeça Isolada	CI	2,4	4,9*	3,3	4,7	4,1	2,9	3,0	4,7	3,4	5,7	5,1	4,8
	CC	2,8	2,1	2,8	2,8	5,1	6,8*	8,1**	6,8	2,6	4,8	4,1	3,6

* p < 0,05

** p < 0,01

Não foram encontrados outros trabalhos que tratassem das alterações do exame andrológico ou morfológico do sêmen de cães infectados (naturalmente ou experimentalmente) com leptospiros para comparação com estes resultados, porém, pelo exposto, mostra-se que há indícios de prejuízos na qualidade desse material em cães expostos às leptospiros.

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).

No presente trabalho, utilizou-se a PCR na investigação de leptospiros em: testículos, epidídimos, próstatas, rim, fígado, urina e 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 sequência do

gene 16S rRNA de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola determinada por FUKUNAGA et al. (1990), devido ao fato de esses “primers” serem gênero-específicos e permitirem a amplificação de vários sorovares de leptospiros apatogênicos e patogênicos (HEINEMANN, 1995).

Pela técnica de PCR, não foi observado resultado positivo em nenhum dos órgãos avaliados. No entanto, pela mesma técnica, foram obtidos resultados promissores na análise de urina e sêmen. Nas Tabelas 13, 14, 15 e 16 estão demonstrados, respectivamente, os resultados da PCR para as amostras de sêmen e urina dos cães infectados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, para os quatro grupos experimentais. A PCR foi negativa para todos os animais utilizados como controle.

É possível observar, na Tabela 13, que nos cinco cães infectados e sacrificados após sete dias (G1), foi detectado DNA de leptospiros no sêmen de um animal (G1A2) no terceiro, quinto e sétimo dias após a inoculação da bactéria. Entretanto não se detectou material genético de leptospira em nenhuma das amostras de urina desses animais, resultado que aponta a possibilidade das leptospiros estarem presentes no sêmen mesmo antes de sua eliminação pela urina, confirmando a teoria de Kiktenko et al. (1976) de que o sêmen poderia ser contaminado desde sua produção e não só durante a passagem pela uretra, ducto excretor comum para urina e sêmen, como propuseram Sleight e Williams (1961).

Tabela 13. Resultado da PCR em amostras de sêmen e urina 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 G1 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em relação ao dia da inoculação							
	0		03		05		07	
	S	U	S	U	S	U	S	U
G1A1	N	N	N	N	N	N	N	N
G1A2	N	N	P	N	P	N	P	N
G1A3	N	N	N	N	N	N	N	N
G1A4	N	N	N	N	N	N	N	N
G1A5	N	N	N	N	N	N	N	N

G1: grupo 1, A: animal infectado S: sêmen U: urina N: negativo P: positivo

Tabela 14. Resultado da PCR em amostras de sêmen e urina 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 G2 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em relação ao dia da inoculação											
	0		03		05		07		10		15	
	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U
G2A1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
G2A2	N	N	N	N	N	N	P	N	P	P	P	P
G2A3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P
G2A4	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
G2A5	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P

G2: grupo 2, A: animal infectado S: sêmen U: urina N: negativo P: positivo

Para o G2 (Tabela 14), 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 1 (G2A1), nos dias sete, dez e quinze para o animal 2 (G2A2), no décimo quinto dia para o animal 3 (G2A3), nos dias três e cinco para o animal 4 (G2A4) e nos dias três e quinze para o cão infectado de número 5 (G2A5). Na urina, pela mesma técnica, nos mesmos animais, só foi possível a detecção de leptospiros em três animais (G2A2, A3 e A5) e ainda assim apenas a partir do décimo dia em um animal (G2A2), que já apresentava leptospiros no sêmen a partir do dia sete pós-inoculação, e no décimo quinto dia nos animais G2A2, A3 e A5.

Os resultados da PCR dos animais do G3 (Tabela 15) explicitam que foi possível detectar DNA nas amostras de sêmen e urina de todos os animais infectados com leptospira. No animal 1 (G3A1), foi detectado DNA da bactéria no sêmen nos dias cinco, sete e quinze e na urina nos dias sete e 15. No sêmen e na urina do animal 2 (G3A2), havia leptospiros desde o sétimo até o vigésimo quinto dia de coleta. Nos dias três, cinco e sete, no sêmen do animal 3 (G3A3), o qual apresentou resultado positivo na urina apenas no dia três. No sêmen, ainda obteve-se PCR positivo no terceiro, quinto, décimo, 25º e 30º dias no animal 4 (G3A4) e nos dias cinco e dez, após a inoculação bacteriana, no animal 5 (G3A5). As amostras de urina do quarto animal do grupo 3 foram positivas na PCR nos dias dez, vinte e cinco e trinta e apenas no dia dez para o quinto cão.

Tabela 15. Resultado da PCR em amostras de sêmen e urina 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 G3 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em relação ao dia da inoculação																	
	0		03		05		07		10		15		20		25		30	
	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U
G3A1	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
G3A2	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N
G3A3	N	N	P	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G3A4	N	N	P	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	P	P	P	P
G3A5	N	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
G3: grupo 3, A: animal infectado S: sêmen U: urina N: negativo P: positivo																		

Podem-se observar na Tabela 16 os resultados da PCR no sêmen e na urina dos cinco animais infectados do G4. Foi possível detectar DNA de leptospira nas amostras de todos os cães inoculados. Para o animal 1 (G4A1), os resultados da PCR foram positivos nos dias sete, quinze, vinte, vinte e cinco e trinta de coleta. Nos dias três e do sétimo ao 45º, todas as amostras de sêmen foram positivas para o animal 2 (G4A2), na urina a partir do décimo dia. Nos dias dez, quinze, vinte e quarenta, as amostras de sêmen e urina do animal 3 (G4A3) foram positivas, e no dia três apenas a amostra de sêmen. Para o animal 4 (G4A4), as amostras de urina foram positivas nos dias sete, dez, vinte, vinte e cinco, trinta e cinco e quarenta de inoculação, e as de sêmen, além de positivas nesses dias, foram também positivas nos dias três e cinco. Já o animal número 5 (G4A5) apresentou amostras de sêmen e urina positivas à PCR nos dias sete e vinte e cinco pós-infecção.

Tabela 16. Resultado da PCR em amostras de sêmen e urina 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 G4 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em relação ao dia da inoculação															
	0		03		05		07		10		15		20		25	
	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U	S	U
G4A1	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P
G4A2	N	N	P	N	N	N	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
G4A3	N	N	P	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	N	N
G4A4	N	N	P	N	P	N	P	P	P	P	N	N	P	P	P	P
G4A5	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	P	P

G4: grupo 4, A: animal infectado S: sêmen U: urina N: negativo P: positivo

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 os de 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 se detectou DNA de leptospira por PCR no 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 arma no diagnóstico precoce da leptospirose.

O limiar de detecção de leptospiros 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 et al. (2000) e MÉRIEN et al. (1992) em sêmen bovino. Entretanto 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 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 na técnica de PCR.

A título de ilustração dos resultados de PCR, foram incluídas as figuras 1, 2 e 3, que mostram respectivamente: o resultado da PCR da amostra de sêmen do cão G1A2 (Figura 1). 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 na amostra de sêmen do cão G4A2 (Grupo 4, animal infectado 2), em que se observa que somente as amostras coletadas nos dias zero e cinco do período experimental foram negativas; e 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.

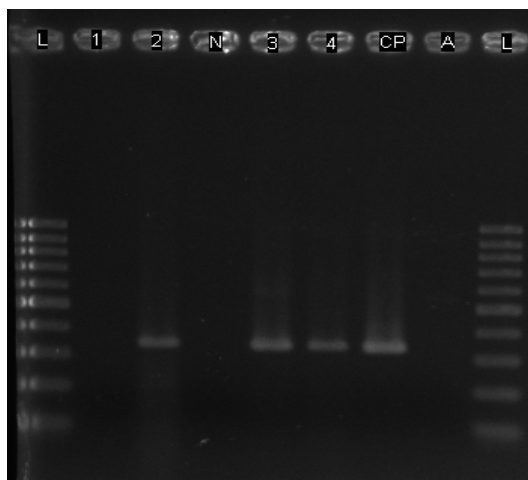


Figura 1. Resultado da PCR em amostra de sêmen do cão G1A2 (Grupo 1, animal infectado dois). L) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 pb; 1) dia zero; 2) dia três; 3) dia cinco; 4) dia sete; N) controle negativo do processo de extração do DNA; A) controle negativo da PCR; CP (controle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

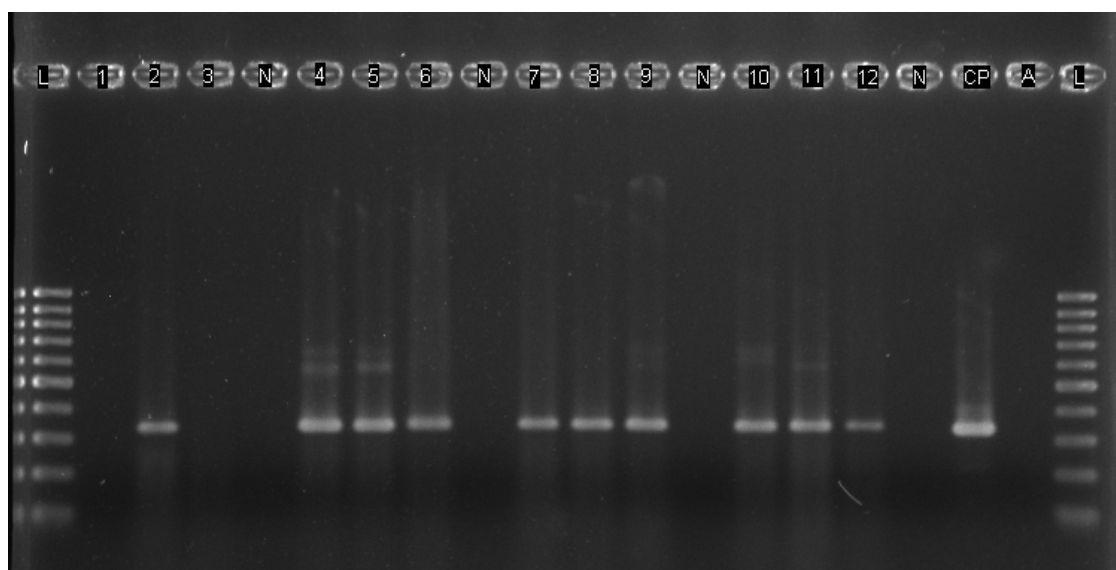


Figura 2. Resultado da PCR em amostra de sêmen do cão G4A2 (Grupo 4, animal infectado dois). L) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 pb; 1) dia zero; 2) dia três; 3) dia cinco; 4) dia sete; 5) dia dez; 6) dia quinze; 7) dia vinte; 8) dia vinte e cinco; 9) dia trinta; 10) dia trinta e 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.

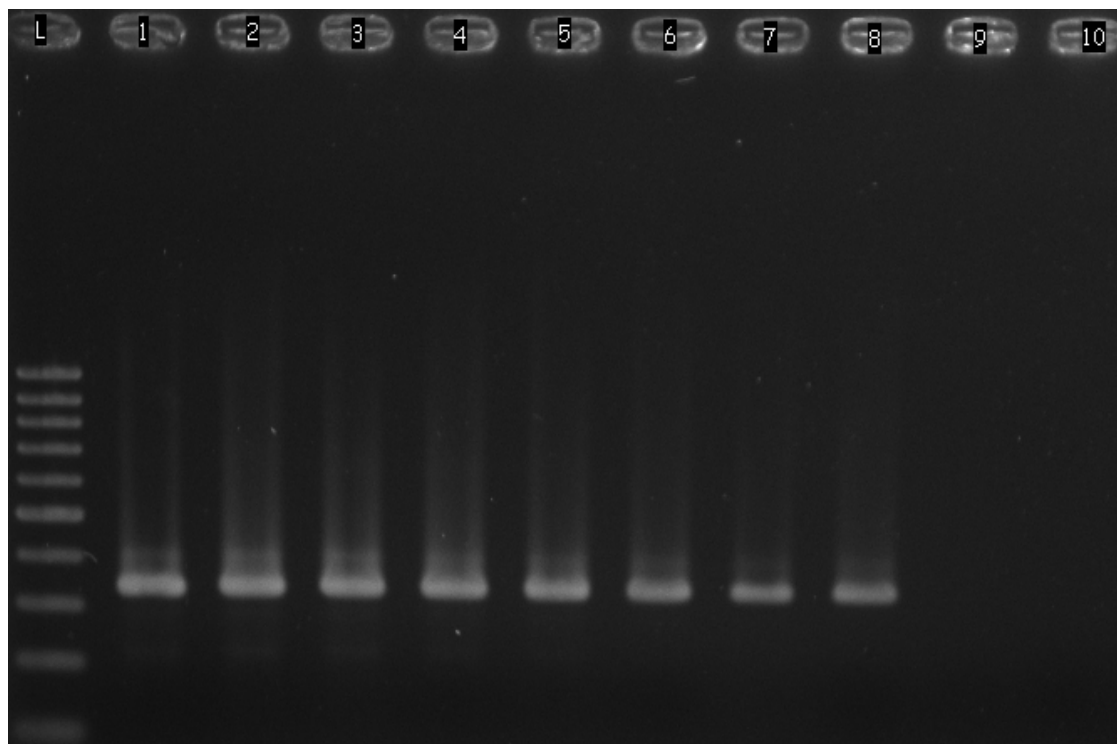


Figura 3. Limiar de detecção de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola por PCR, a partir do DNA obtido pela técnica de extração com isotiocianato de guanidina, de amostras de sêmen canino experimentalmente contaminado. 1) Cultura pura com 10^8 leptospiros por mL; 2) Sêmen com 10^7 leptospiros por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

Na avaliação histopatológica dos órgãos estudados (rim, fígado, próstata, epidídimo e testículo), foram observadas alterações apenas nas próstatas dos cinco animais infectados do grupo 4 com forte indício de prostatite (Figura 4). Pela técnica de Levaditi, apenas em um corte histológico do fígado do animal G3A5 do grupo 3, ou seja, sacrificado 30 dias após a inoculação da cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, foi encontrada leptospira (Figura 5).

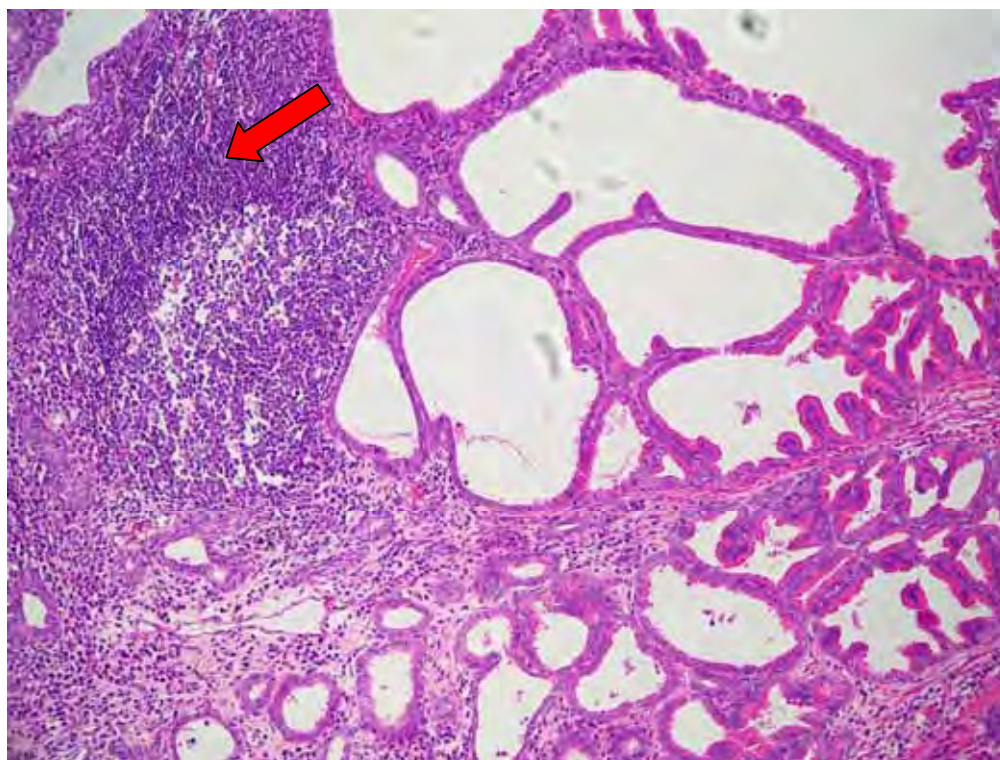


Figura 4: Fotomicrografia de corte histológico da próstata do animal infectado G4A3, utilizando a técnica de coloração Hematoxilina e Eosina, mostrando a presença de prostatite, evidenciada através de células de inflamação infiltrativas. Aumento de 100x.

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 na estrutura dos órgãos.

Embora diversos autores (BRANDESPIM et al., 2003; CAMARGO et al., 1993; CAMARGO, 1996) considerem a técnica de Levaditi eficaz no diagnóstico de leptospirose. em órgãos do aparelho reprodutor de machos e fêmeas, no presente estudo não foi possível detectar leptospiros nos fragmentos de testículos,

próstata e epidídimo dos cães experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola pelo período de 45 dias.

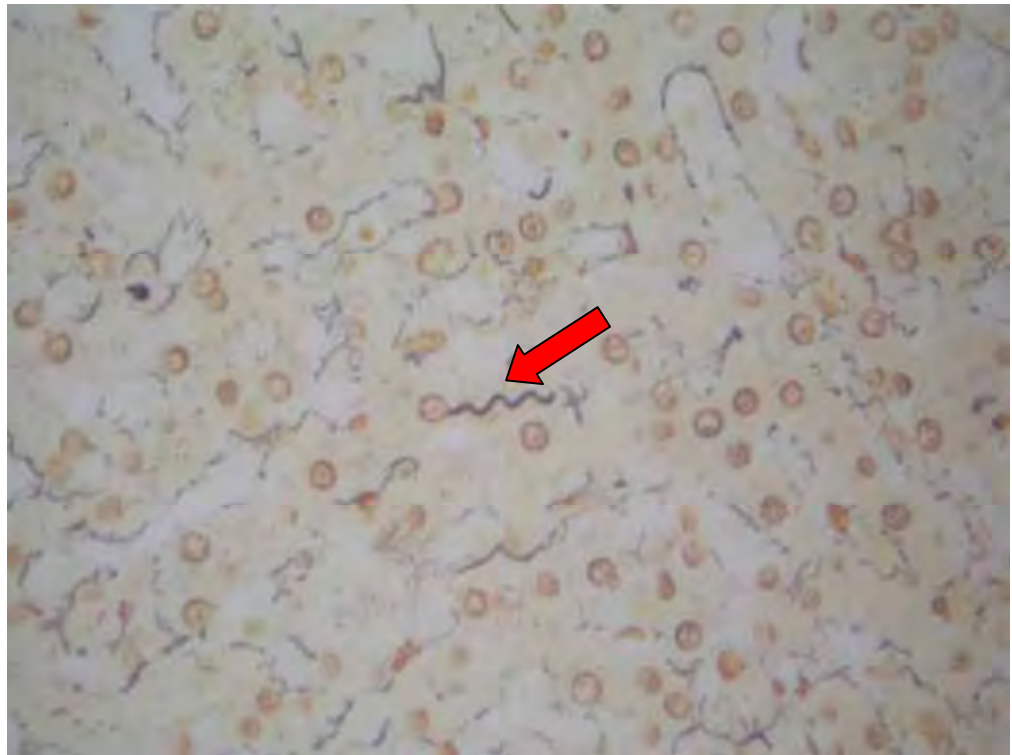


Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico do fígado de animal infectado utilizando a técnica de coloração Levaditi, mostrando a presença de leptospiros. Aumento de 400x.

A análise comparativa dos valores das médias referentes ao hemograma e aos parâmetros bioquímicos do sangue dos cães infectados (CI) e de controle (CC), de cada grupo, para verificar possíveis diferenças significativas entre esses valores, durante o período experimental está demonstrada nas tabelas 18 a 20. Em nenhum dos animais foi observada a presença de hemoparasitas. Embora tenham sido analisados 13 parâmetros do hemograma (hemácias, leucócitos,

hematócrito, hemoglobina, basófilos, eosinófilos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, linfócitos, monócitos, plaquetas, VCM e CHCM) e oito da série bioquímica do sangue (uréia, creatinina, fosfatase alcalina, ALT, colesterol, albumina, glicose, cálcio), apenas foram observadas alterações significativas, ou seja, valores fora dos padrões normais, nos valores de hemácias, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, plaquetas, uréia, fosfatase alcalina e cálcio, sendo as médias dos valores desses parâmetros apresentadas nas tabelas a seguir.

Observa-se, na tabela 18, que houve diferença significativa ($<0,01$) maior para os animais infectados apenas na média de neutrófilos segmentados no quinto dia pós-infecção no G1. Embora o aumento de neutrófilos segmentados seja uma alteração esperada em animais com leptospirose, esse valor ainda estava dentro dos padrões (SILVEIRA, 1996). Para o G2 do experimento, a única variável a apresentar uma alteração significativamente ($p<0,05$) maior para os animais infectados foi o cálcio, no décimo dia de experimento (Tabela 19).

Tabela 17. Média aritmética do número de hemácias, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, plaquetas e da concentração de uréia, fosfatase alcalina, albumina e cálcio de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental 1 (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de sangue com relação ao dia da inoculação			
		0	03	05	07
Hemácias ($10^3/\text{mm}^3$)	CI	6152	6194	5876	6014
	CC	6566	6376	6013	6446*
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	CI	11060	9080	8500	9020
	CC	12300	11200	101200	8966
Neutrófilos segmentados (%)	CI	71	67	75**	70
	CC	68	66	58	61
Linfócitos (%)	CI	17	23	16	19
	CC	19	19	27*	25
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	CI	179	239	201	229
	CC	179	258	178	233
Uréia (mg/dL)	CI	50	27	29	32
	CC	45	24	33	35
Fosfatase alcalina (u/L)	CI	82	177	106	107
	CC	112	150	142	136
Albumina (g/dL)	CI	3	2,6	2,7	2,8
	CC	2,3	2,4	2,8	2,7
Cálcio (mg/dL)	CI	8,9	16,7	11,3	14,1
	CC	9,2	13,5	12,6	13,4

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Tabela 18. Média aritmética do número de hemácias, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, plaquetas e da concentração de uréia, fosfatase alcalina, albumina e cálcio de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental 2 (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação					
		0	03	05	07	10	15
Hemácias ($10^3/\text{mm}^3$)	CI	6464	6960	6906	6526	6612	6936
	CC	7106	7026	7053	6783	6830	6863
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	CI	9240	9300	14000	9900	10040	12440
	CC	9466	9666	9833	9500	9500	9866
Neutrófilos segmentados (%)	CI	67	65	75	62	61	70
	CC	70	68	71	71	72	68
Linfócitos (%)	CI	14	22	14	20	21	17
	CC	21	24	21*	20	20	21
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	CI	147	158	164	169	211	237
	CC	210	268	209	212	211	222
Uréia (mg/dL)	CI	28	31	26	27	22	40
	CC	34	38	39	35	28	38
Fosfatase alcalina (u/L)	CI	139	40	130	114	121	94
	CC	100	108	101	96	91	93
Albumina (g/dL)	CI	2,5	2,6	2,5	2,4	2,2	2,8
	CC	2,9	2,6	2,9	2,8	2,7	2,7
Cálcio (mg/dL)	CI	6,6	10,3	11,6	11,6	14,1*	13,6
	CC	10,3	9,4	11,3	9,9	10,1	11,5

* $p < 0,05$

Já no G3, observaram-se algumas alterações mais relevantes, como uma diferença significativamente maior ($p<0,01$) na média do número de hemácias nos cães de controle a partir do dia três até o dia do sacrifício dos animais desse grupo, ou seja, dia 30. Também houve uma diferença significativamente maior ($p<0,01$) na média do número de leucócitos nos animais infectados em relação aos controles nos dias três a dez e com $p<0,05$ no dia quinze, a média de linfócitos também foi significativamente maior nos animais controles nos dias 20 a 30, as plaquetas nos dias sete e dez. Esses resultados eram os esperados para os cães com leptospirose (SILVEIRA, 1996). Para a fosfatase alcalina, as médias dos dias três ao vinte foram significativamente maiores nos animais infectados que nos de controle. Esse aumento de fosfatase alcalina pode estar indicando uma alteração hepática do tipo obstrução biliar (JORGE, 2008) (Tabela 20).

No G4, não houve diferença significativa para a variável hemácia, mas observou-se que em vários dias os números de leucócitos, neutrófilos segmentados e plaquetas estavam significativamente maiores nos animais infectados em relação aos de controle, e o número de linfócitos estava significativamente maior nos animais de controle. No 45º dia pós-inoculação, a média dos valores de uréia estava significativamente maior ($p<0,01$) nos animais infectados, e no dia três a média dos valores da fosfatase alcalina estava significativamente maior ($p<0,01$) nos animais infectados (Tabela 21).

Tabela 19. Média aritmética do número de hemácias, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, plaquetas e da concentração de uréia, fosfatase alcalina, albumina e cálcio de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental 3 (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
Hemácias ($10^3/\text{mm}^3$)	CI	7378	7052	6566	6732	6736	6940	6900	6986	7092
	CC	8163	8063**	7926**	7943**	7923**	7930**	8050**	7773**	7980**
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	CI	20220	34800**	20660**	17340**	17740**	16240*	14300	13500	13640
	CC	11600	11500	12166	11233	11733	11000	10966	12066	11266
Neutrófilos segmentados (%)	CI	62	79	64	64	68	66	55	52	55
	CC	68	70	68	71	69	68	69	65	69
Linfócitos (%)	CI	22	10	18	16	19	22	25*	27**	27**
	CC	17	16	17	16	16	18	17	17	15
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	CI	285	248	255	300**	269**	245	237	228	265
	CC	227	231	223	226	231	222	228	223	230
Uréia (mg/dL)	CI	56	19	20	32	24	16	13	29	42
	CC	55	54	44	48	45	46	39	44	47
Fosfatase alcalina (u/L)	CI	122	194**	154**	143**	135*	153**	140*	116	126
	CC	84	87	82	83	86	81	85	80	88
Albumina (g/dL)	CI	3,3	3,0	3,3	2,7	2,7	3,1	2,8	2,0	3,0
	CC	3,1	3,2	3,2	3,0	2,7	3,1	3,0	3,0	3,0
Cálcio (mg/dL)	CI	11,7	13,1	8,8	11,0	6,7	10,1	9,7	10,1	10,0
	CC	10,4	11,6	10,6	12,5	10,1	10,8	10,4	10,7	10,5

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Em relação aos parâmetros físicos, bioquímicos e sedimentares da urina dos animais de controle e infectados, não foram observadas alterações quanto ao padrão normal para a espécie.

Quanto às características clínicas e aos parâmetros fisiológicos dos animais estudados, observou-se que nenhum animal apresentou alterações na coloração das mucosas, apatia, hemoglobinúria, uremia, glossite ou estomatite. Embora no grupo 2 tenha sido observada uma alteração significativamente maior na frequência respiratória dos animais infectados em relação aos de controle, essa diferença pode ser atribuída a uma variação individual de um dos animais do grupo (Tabela 23). A comparação da média aritmética dos parâmetros físicos temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa corpórea entre os animais infectados e os de controle está representada nas Tabelas 22 a 25.

Tabela 21. Média aritmética da temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa (Kg) de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante quatro avaliações num período de sete dias, representando o grupo experimental 1 (G1). Jaboticabal, São Paulo, 2007

Parâmetros		Dias de coleta de sangue com relação ao dia da inoculação			
		0	03	05	07
Temperatura (°C)	CI	39,0	38,6	38,7	38,8
	CC	38,5	38,6	38,9	39,4
Frequência cardíaca (/minuto)	CI	147	119	106	97
	CC	115	92	88	88
Frequência respiratória (/minuto)	CI	48	47	38	40
	CC	41	41	41	41
Massa (Kg)	CI	11,3	11,1	10,9	11,3
	CC	10,7	10,6	10,5	10,7

Tabela 22. Média aritmética da temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa (Kg) de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante seis avaliações num período de 15 dias, representando o grupo experimental 2 (G2). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de sêmen com relação ao dia da inoculação					
		0	03	05	07	10	15
Temperatura (°C)	CI	38,9	38,8	39,0	39,0	39,1	39,3
	CC	38,4	38,8	38,9	39,5	39,5	39,1
Frequência cardíaca (/minuto)	CI	100	96	92	86	88	90
	CC	101	99	85	84	91	88
Frequência respiratória (/minuto)	CI	63	63**	59**	55	52*	59*
	CC	42	44	39	46	40	47
Massa (Kg)	CI	17,4	17,0	17,1	17,2	17,4	17,4
	CC	8,9	8,7	8,6	8,9	8,9	8,9

* p < 0,05 ** p < 0,01

Tabela 23. Média aritmética da temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa (Kg) de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante nove avaliações num período de 30 dias, representando o grupo experimental 3 (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
Temperatura (°C)	CI	38,9	38,9	38,6	39,1	38,8	39,0	38,9	39,0	39,1
	CC	38,2	39,0	39,1	39,4	39,7	39,3	38,6	38,9	38,9
Frequência cardíaca (/minuto)	CI	80	89	84	82	84	89	92	93	94
	CC	94	99	85	99	99	103	101	96	96
Frequência respiratória (/minuto)	CI	56	65	57	57	60	72	63	60	70
	CC	72	65	59	67	64	71	63	64	69
Massa (Kg)	CI	9,6	9,4	9,3	9,2	9,2	9,3	9,4	9,6	9,5
	CC	12,7	12,6	12,6	12,8	12,9	13,1	13,0	12,8	12,9

Tabela 24. Média aritmética da temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e massa (Kg) de cinco cães infectados (CI) e três cães de controle (CC) durante doze avaliações num período de 45 dias, representando o grupo experimental 4 (G4). Jaboticabal, São Paulo, 2007.

Parâmetros		Dias de coleta de sangue com relação ao dia da inoculação											
		0	03	05	07	10	15	20	25	30	35	40	45
Temperatura (°C)	CI	38,4	38,8	38,5	39,1	38,9	39,0	38,8	39,1	38,8	38,8	38,8	38,7
	CC	39,3	39,5	39,4	38,7	39,2	38,5	39,2	38,5	38,6	38,9	38,9	39,1
Frequência cardíaca (/minuto)	CI	101	91	87	88	90	93	94	88	93	89	92	95
	CC	98	92	96	92	90	88	93	87	89	89	91	91
Frequência respiratória (/minuto)	CI	73	64	63	58	55	62	61	58	60	56	56	60
	CC	76	70	72	70	73	70	72	71	70	74	75	74
Massa (Kg)	CI	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,6	7,8	7,7	7,9	7,9	7,9	7,8
	CC	10,3	10,2	10,2	10,2	10,3	10,4	10,5	10,5	10,6	10,5	10,6	10,5

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).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e analisados, a partir da infecção experimental com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, nas condições em que o presente estudo foi realizado e segundo a metodologia empregada, possibilitaram as seguintes conclusões.

1. Foi possível detectar material genético de leptospiros, pela técnica de PCR, em sêmen de cães experimentalmente infectados a partir do terceiro dia da inoculação, quando os títulos sorológicos pela prova de SAM ainda eram muito baixos ou mesmo inexistentes; e na urina iniciou-se a partir do sétimo dia pós-inoculação, quando os títulos sorológicos pela SAM já estavam sendo registrados e na sua maior parte acima de 100, sugerindo que a eliminação de leptospiros no sêmen canino pode iniciar-se anteriormente à leptospirúria.
2. Cães experimentalmente infectados com leptospiros mostram declínio da motilidade, do vigor e da concentração espermática, podendo apresentar um aumento na porcentagem de espermatozoides com defeitos, como observado no grupo 2 deste experimento, em que, nos dias cinco, sete, dez e quinze, a porcentagem de defeitos maiores encontrada estava acima de 10%, evidenciando um prejuízo na qualidade deste ejaculado.
3. Pela análise morfológica dos espermatozoides e pelos achados macroscópicos (durante necropsia) e microscópicos (por meio de coloração com HE de cortes de tecido das próstatas dos animais infectados), pode-se associar a infecção por leptospiros em cães com a ocorrência de prostatite; já pela técnica de coloração de Levaditi, não foi possível verificar a

presença de leptospiros nos testículos, nos epidídimos, na próstata ou nos rins dos cães experimentalmente infectados e eutanasiados até o 45º dia após a inoculação da cepa patogênica. Por meio dessa técnica, só foi possível observar a presença de leptospira em um corte de fígado de um animal do grupo 2.

4. O exame hematológico apontou para um aumento do número de linfócitos, plaquetas e neutrófilos segmentados e uma diminuição do número de hemácias a partir do terceiro dia pós-infecção, e o exame bioquímico do sangue revelou um aumento de uréia no 45º dia e um aumento de fosfatase alcalina a partir do 30º dia, indicando possíveis alterações nas funções hepáticas e renais dos animais infectados; apesar disso, durante os 45 dias de inoculação, não foi possível observar alterações na composição ou nas características físicas das urinas dos animais examinados.

7. REFERÊNCIAS*

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. p. 112-120. (Publicación Científica, 503).

AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F.; PATH, M. R. C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, 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.

BAKER, C. D. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 170-187.

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

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.

* Formatação segundo normas vigentes da Seção de Pós-graduação da FCAV-UNESP.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* typo *hardjo-bovis* in bovine urine. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg 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 Veterinária**, 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. 98 p.

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 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. 79 f. 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. ; MORAIS, Z. M. ; NÜRMBERGER JÚNIOR, R. ; HEINEMANN, M. B. . Pesquisa de leptospiros nos ovários, úteros e embriões de hamsters experimentalmente infectados e induzidos à condição de portadores renais através do tratamento com o estolato de eritromicina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 65, n. 1, p. 75-80, 1998.

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. 46 p. (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. **Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi**, Ankara, 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.

DRAK ELETRÔNICA E COMÉRCIO. **Manual do aparelho de bioquímica QUICK-LAB, número de registro no Ministério da Saúde: 103462240013**. São José do Rio Preto, 2002. 94 p.

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 leptospires 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.

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

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

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

FETTMAN, J. M.; REBAR, A. Avaliação laboratorial da função renal. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007a. p. 285-310.

FETTMAN, J. M.; REBAR, A. Metabolismo de fluidos e eletrólitos. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007b. p. 311-334.

FREITAS, JC; SILVA, FG; OLIVEIRA, RC; DELBEM, ACB, MULLER, EE; ALVES, LA; TELES, PS Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. *Revista Ciencia Rural*, V.34, n. 3, p.853-856, 2004.

FUKUNAGA, M.; HORIE, I.; OKUZAKO, N.; MIFUCHI, I. Nucleotide sequence of 16S RNA 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, 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, 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 Genetic Microbiology**, v. 139, n. 8, p. 1691-1700, 1993.

HANSON, L. E. Immunology of bacterial diseases with special reference to leptospirosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 170, n. 9, p. 991-994, 1977.

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

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MORAES, Z. M.; GREGORI, F.; CORTEZ, A.; VASCONCELLOS, S. A.; VISINTIN, J. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 1, p. 32 – 34, 1999

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 polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

HORIBAABX. **ABC VET**: manual – série 609AB11-224. Montpellier, 2001.165 p

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 end feline theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 287.

JORGE, S. G. **Exames laboratoriais**. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>>. Acesso em: 18 ago. 2008.

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, n. 3, 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**. Groningen: University Press Groningen, 1993.

LASSEN, D. E. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007a. p. 376-390.

LASSEN, D. E. Avaliação laboratorial do fígado. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007b. p. 335-354.

LASSEN, D. E.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em medicina veterinária. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 3-36.

LEES, E. G.; WILLARD, D. M.; GREEN, A. R.. Urinary disorders. In: WILLARD, D. M.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, H. G. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 2. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1994. p. 115-146.

MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S.; MATHIAS, L. A.; RODRIGUES, L. H. Características do semen de touros sorológicamente reagentes a *Leptospira interrogans* sorovariedade Hardjo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 28, n. 1, p. 34-39, 2004.

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 engeneering. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 51-58.

MASCOLLI, R. ; PINHEIRO, S. R. ; VASCONCELLOS, S. A. ; FERREIRA, F. ; MORAIS, Z. M. ; PINTO, C. O. ; SUCUPIRA, M. C. A. ; DIAS, R. A. ; MIRAGLIA, F. ; CORTEZ, A. ; COSTA, S. S. ; TABATA, R. ; MARCONDES, A. G 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**, Ottawa, v .61, n. 1, p. 15-20, 1997.

MCMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staining methods – histologic and histochemical**. 3. 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.

NAVARRO, K. G.; EUGENIO, C. **Manual de urinálise veterinária**. São. Paulo: Livaria Varela, 1996. 110 p.

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**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, 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, 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**. Melbourne: Australian Quarantine and Inspection Service, 2000. 91 p.

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 stud. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 48, n. 4, p. 363-371, 1958.

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

RODINA, V. N.; BALASHOV, N. G. Leptospirosis infection of animals transmitted through insemination. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 19., 1971, Mexico. **Proceedings...** v. 2, p. 707-708.

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**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 957 p.

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

SAS INSTITUTE. **User's guide**: statistics. Version. 5. ed. Cary, 1985. 956 p.

SEAGER, S. W. J. **Artificial insemination in dogs**. In: BURKE, T. J.: Small animal reproduction and infertility. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 207-217.

SILVEIRA, J. M. **Interpretação de exames laboratoriais em veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1996. 214 p.

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.; WILLIAMS, J. A. Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 138, n. 1, p. 151-152, 1961.

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.

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

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

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

THRALL, A. M. Anemia arregenerativa ou não regenerativa. In: _____. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007a. p. 84-88.

THRALL, A. M. Anemia regenerativa. In: _____. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007b. p. 89-113.

THRALL, A. M. Classificação e diagnóstico de anemia. In: _____. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007c. p. 78-83.

THRALL, A. M. Classificação e diagnóstico de policitemia. In: _____. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007d. p. 114-117.

THRALL, A. M. Morfologia das hemácias. In: _____. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007e. p. 65-77.

TVEDTEN, H. Erythrocyte disorders. In: _____. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 2. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1994a. p. 31-51.

TVEDTEN, H. Leukocyte disorders. In: _____. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 2. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1994b. p. 53-79.

TVEDTEN, H. Hemostatic abnormalities. In: _____. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 2. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1994c. p. 81-95.

VASCONCELLOS, S. O papel dos reservatórios na manutenção de leptospiros 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 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.

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.

WEISER, G. Coleta de processamento de amostras e análise das opções de serviços laboratoriais. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007a. p. 37-42.

WEISER, G. Interpretação da resposta leucocitária nas doenças. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007b. p. 127-140.

WEISER, G. Produção, migração e cinética do neutrófilos. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007c. p. 123-126.

WEISER, G.; THRALL, A. M. Considerações sobre leucócitos e leucograma. In: THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica e veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 118-122.

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.

ANEXO 1

Solução, meios de cultura, diluidores e tampões utilizados no trabalho.

1 – SOLUÇÃO

Solução tamponada da Sörensen pH 7,5

- Fosfato di-sódico anidro.....8,33g
- Fosfato monopotássico.....1,09g
- Água destilada.....1000mL

2 – MEIOS DE CULTURA

a) EMJH (Difco – 0987-01)

- Sódico fosfato dibásico.....1g
- Potássio fosfato monobásico.....0,3g
- Cloreto de sódio.....1g
- Cloreto de amônia.....0,25g
- Tiamina.....0,005g
- Água destilada.....900mL
- Enriquecimento com 10% de soro sanguíneo de coelho

b) Fletcher (Difco – 0987-01)

- Bacto-peptona.....0,3g
- Bacto-extrato de carne.....0,2g
- Cloreto de sódio.....0,5g
- Bacto-ágar.....1,5g
- Água destilada.....900mL
- Enriquecimento com 10% de soro sanguíneo de coelho

3 – DILUIDORES

a) TE pH 7,4

- Tris HCl 10mM
- EDTA 1mM (Ethylenediaminetetracetic acid – sal)

b) Solução tampão de lise (proteinase K)

- Proteinase K a 20mg/mL.....15μL
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%....30μL
- TNE 5x.....60μL
- Água ultrapura.....195μL
-

c) TNE 5x pH 8,0

- Tris 50mM
- NaCl 500mM
- EDTA 125mM

d) Solução tampão de reação 10x pH 9,0

- KCl.....500mM
- MgCl₂.....15mM
- Tris HCl.....100mM

4 – GEL DE AGAROSE 2,0%

- Tampão TBE (0,5 x).....100mL
- Agarose.....2,0g

5 – TAMPÃO DE CORRIDA TBE pH 8,0

- Tris acetato 0,004M
- EDTA 0,001M

6 – SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA

- | | |
|--------------------|-------------|
| ▪ Nitrato de prata | 2,0g |
| ▪ Água deionizada | q.s.p.100mL |

7 – SOLUÇÃO REDUTORA

- | | |
|--------------------|-------------|
| ▪ Ácido pirogálico | 4,0g |
| ▪ Formol puro | 5mL |
| ▪ Água deionizada | q.s.p.100mL |

ANEXO 2

HEMOGRAMA

Após homogeneização da amostra com EDTA, utilizou-se uma gota de sangue para realização do esfregaço em lâmina identificada com o nome ou RG do animal. O restante da amostra foi utilizada para a contagem dos glóbulos vermelhos e brancos. Para tanto, utilizou-se um contador automático, como se segue (TVEDTEN, 1994b).

Contador Automático ABC-VET (HORIBAABX, 2001).

Diluição (diluidor DA 500)

- Diluição para glóbulos brancos (posição **WBC**)
- Diluição para glóbulos vermelhos (posição **RBC**), utilizando como amostra o béquer da diluição dos glóbulos brancos;
- Colocamos 2 gotas de hemolisante (Cellmlise II) no béquer da diluição de glóbulos brancos e homogeneizar bem;

Operação (CELM CC 530) (HORIBAABX, 2001).

- Deixamos sempre um béquer com solução Isocellm II no transdutor; ligamos o aparelho. Automaticamente o aparelho fez um ciclo de limpeza, e o display indica **0** (zero).

Contagem de glóbulos vermelhos (THRALL, 2007d; TVEDTEN, 1994a).

- Seleção **RBC** com a tecla [**RBC/WBC**];
- Colocamos o béquer, com a amostra diluída, no transdutor;
- Contagem apertando [**COUNT**];
- Apareceu no display o valor de **RBC**.

Contagem de glóbulos brancos e dosagem de hemoglobina (TVEDTEN, 1994c; WEISER, 2007a; WEISER, 2007c; WEISER, 2007b).

- Preparação da diluição para **WBC**, homogeneização e colocação no transdutor;
- Seleção **WBC** com a tecla [**RBC/WBC**];
- No caso de dosagem de hemoglobina, seleção **HGB**;
- Contagem de glóbulos brancos apertando [**COUNT**];
- Aparecendo no display o valor de **WBC**, e o *led* indicador **HGB** acendendo intermitentemente (indicando que se for necessário repetir a contagem com a tecla [**REPEAT**] o aparelho não fará uma nova dosagem de **HGB**);
- Ao final de cada contagem, desprezo do restante de cada amostra e lavagem do béquer com água corrente, secagem e reutilização.

Hematócrito – volume globular (THRALL, 2007c; THRALL, 2007a).

- Homogeneização da amostra, em seguida enchimento de sangue aproximadamente $\frac{3}{4}$ do tubo de micro-hematócrito;
- Fechamento de uma das extremidades com massa selante ou pelo fogo;
- Centrifugação por 5 minutos em centrífuga apropriada;
- Leitura no cartão especial.

Proteína Plasmática Total (FETTMAN & REBAR, 2007b; LASSEN, 2007a).

- Quebra do microtubo (utilizado no hematócrito) acima do nível dos eritrócitos;
- Colocação de uma gota do plasma no refratômetro;
- Leitura na coluna da esquerda, resultado em g/ dL.

Contagem de Eritrócitos em Câmara de Neubauer (THRALL, 2007e; THRALL, 2007b).

- Sangue total com EDTA;

- Líquido de Hayem

- bicloreto de mercúrio	0,5 g
- cloreto de sódio	1,0 g
- sulfato de sódio	5,0 g
- água destilada	100,0 mL
- Diluição 1: 200. O mais correto é a utilização da pipeta de diluição de eritrócitos (pipeta de Thomas).
- Colocação da câmara em repouso, por 5 minutos, em câmara úmida;
- Realização da contagem em microscópio, no aumento 40 x, em 5 grupos de 16 quadradinhos no centro da câmara, multiplicando o número de eritrócitos contados por 10.000.

Contagem de leucócitos em Câmara de Neubauer (WEISER, 2007b).

- Sangue total com EDTA;
- Pipeta para glóbulos brancos;
- Líquido de Türk

- ácido acético glacial	1 mL
- violeta de genciana	1 mL
- água destilada	100 mL
- Diluição 1: 20, o mais correto é a utilização da pipeta de diluição de leucócitos.
- Preenchimento da câmara;
- Usando a objetiva 10 x contagem dos leucócitos nos quatro conjuntos de 16 quadrados encontrados nos quatro extremos da câmara, somandos os resultados e multiplicando por 50.

Contagem diferencial dos leucócitos (WEISER, 2007b).

- Coloração do esfregaço com o *kit* Instant Prov[®]
- Examinada ao microscópio, objetiva de imersão 100x

Contagem de plaquetas (WEISER, 2007a).

- Contagem de plaquetas no mesmo esfregaço utilizado na contagem diferencial de leucócitos;
- Contagem das plaquetas em 5 – 10 campos (dependendo da quantidade de plaquetas), fazendo a média e multiplicando por 15.000.
- O resultado foi expresso em mm^3 .

BIOQUÍMICA SÉRICA

Tipos de amostra para realização de cada exame (LASSEN e WEISER, 2007).

MÉTODO	AMOSTRA
Creatinina	Soro/ plasma (EDTA ou Heparina)
ALT (Alanina Amino Transferase)	Soro/ plasma (EDTA ou Heparina)
AST (Aspartato Amino Transferase)	Soro/ plasma (EDTA ou Heparina)
Fosfatase Alcalina	Soro/ plasma (Heparina)
Albumina	Soro
Uréia	Soro/ plasma (EDTA ou Heparina)
Proteína Total	Soro
CK-NAC (Creatino-fosfoquinase)	Soro/ plasma (Heparina)

- O aparelho utilizado para a realização dos bioquímicos foi o Quick-Lab - Drake.(DRAK ELETRÔNICA E COMÉRCIO, 2002).
- Seguimos os passos solicitados pelo aparelho (específicos para cada técnica).
- Recomendou-se que a amostra só fosse colocada no reagente de trabalho no momento em que o aparelho estivesse pronto para recebê-la. Após colocação da amostra no reagente, homogeneização rápida, não demorando mais que 10 segundos para inseri-la no aparelho. Para cada teste existiu um procedimento diferente no preparo dos reagentes de trabalho, que pôde ser encontrado na bula de cada método. Nesse caso

foram utilizados os **kits da Katal**. A seguir, encontra-se um resumo dos procedimentos utilizados no preparo de pequenas quantidades de cada reagente.

CREATININA Soro / Plasma (EDTA ou Heparina) KATAL					
Reagente de Trabalho	Quantidade Reagente	Quantidade Amostra	Branco	Padrão	Banho-maria 37°C
2,0 ml Tampão	1 mL	100 µL	-	-	-
0,5 ml Ácido Pícrico	1 mL	-	-	100 µL	-

Fonte: FETTMAN e REBAR, 2007a).

URÉIA Soro / Plasma (EDTA ou Heparina) KATAL					
Reagente de Trabalho	Quantidade Reagente	Quantidade Amostra	Branco	Padrão	Banho-maria 37°C
2,0 ml Tampão	1 mL	10 µL	-	-	-
20 µl Enzima	1 mL	-	-	10 µL	-
20 µl Coenzima					

Fonte: FETTMAN e REBAR, 2007a.

ALT - Alanina Amino Transferase Soro / Plasma (EDTA ou Heparina) KATAL					
Reagente de Trabalho	Quantidade Reagente	Quantidade Amostra	Branco	Padrão	Banho-maria 37°C
2,5 ml Tampão	1 mL	100 µL	-	-	-
25 µl Enzima					
25 µl Coenzima					

Fonte: LASSEN, 2007b.

AST - Aspartato Amino Transferase Soro / Plasma (EDTA ou Heparina) KATAL					
Reagente de Trabalho	Quantidade Reagente	Quantidade Amostra	Branco	Padrão	Banho-maria 37°C
2,5 ml Tampão	1 mL	100 µL	-	-	-
25 µl Enzima					
25 µl Coenzima					

Fonte: LASSEN, 2007b.

FOSFATASE ALCALINA Soro / Plasma (Heparina) KATAL					
Reagente de Trabalho	Quantidade Reagente	Quantidade Amostra	Branco	Padrão	Banho-maria 37°C
0,9 ml Tampão 0,1 ml Substrato	1 mL	20 µL	-	-	-

Fonte: LASSEN, 2007b.

ALBUMINA Soro KATAL					
Reagente de Trabalho	Quantidade Reagente	Quantidade Amostra	Branco	Padrão	Banho-maria 37°C
50 ml Reagente cor-estoque, completar p/ 500ml água destilada/deionizada (estável 6 meses 8°C)	2 mL 2 mL 2 mL	10 µL - -	- - -	- - 10 µL	15 minutos temperatura ambiente

Fonte: BAKER, 2007.

PROTEÍNAS TOTAIS Soro KATAL					
Reagente de Trabalho	Quantidade Reagente	Quantidade Amostra	Branco	Padrão	Banho-maria 37°C
50 ml Biureto-estoque, completar p/ 500ml deionizada (estável 6 meses 0°C ambiente)	2,5 mL 2,5 mL 2,5 mL	50 µL - -	- - 50 µL água	- - 50 µL	15 minutos temperatura ambiente

Fonte: FETTMAN e REBAR, 2007b.

URINÁLISE

- Ao chegar ao laboratório, as amostras foram transferidas para tubo cônico, a partir do qual foi realizado o exame físico e, posteriormente, a centrifugação para a realização da análise do sedimento (NAVARRO & EUGENIO, 1996; LEES et al. 1994).

Exame físico da urina

- **Cor:** amarelo-ouro, amarelo-citrino, âmbar, avermelhada...
- **Aspecto:** límpido, turvo, ligeiramente turvo...
- **Odor:** característico/ *sui generis*, fétido...
- **Densidade:** colocação de uma gota no refratômetro e realização da leitura na coluna da direita.

Exame químico da urina:

- Realizado com tiras de plástico (**Combur Test UX 10 – Roche**) que contêm pedacinhos de papel de várias cores embebidos em reagentes químicos, os quais mudam de cor quando em contato com determinadas substâncias eventualmente presentes na urina.

Exame do sedimento urinário:

- O sedimento pôde ser visto à fresco ou corado, mas deve ser sempre feito de amostra recente, porque a demora (mais de 2 horas) pode determinar a fragmentação de certos elementos, principalmente nas urinas alcalinas.
- Para preparação do sedimento, centrifugação da amostra em tubo cônico por 5 a 10 minutos (1.000 a 1.500 rpm); desprezando o sobrenadante, colocação de uma gota de sedimento sobre uma lâmina cobrindo-a em seguida com lamínula; observação com objetiva de 40 x, com pouca luz.

- Nos sedimentos podemos observar: hemácias, leucócitos, células epiteliais prepuciais, células caudadas da pelve renal, células de transição, bactérias, leveduras, cilindros e cristais.