

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“ISOLAMENTO E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA
Leptospira spp. EM AMOSTRAS RENAIIS E HEPÁTICAS DE OVINOS
SOROLOGICAMENTE POSITIVOS E NEGATIVOS PARA LEPTOSPIROSE,
ABATIDOS EM FRIGORÍFICO, PROCEDENTES DO ESTADO DE SÃO PAULO”.

PRISCILA BARBANTE

Botucatu – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“ISOLAMENTO E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA
Leptospira spp. EM AMOSTRAS RENAIIS E HEPÁTICAS DE OVINOS
SOROLOGICAMENTE POSITIVOS E NEGATIVOS PARA LEPTOSPIROSE,
ABATIDOS EM FRIGORÍFICO, PROCEDENTES DO ESTADO DE SÃO PAULO”.

PRISCILA BARBANTE

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Co-orientador: Prof. Titular Hélio Langoni

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Barbante, Priscila.

Isolamento e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. em amostras renais e hepáticas de ovinos sorologicamente positivos e negativos para leptospirose, abatidos em frigoríficos, procedentes do Estado de São Paulo / Priscila Barbante. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Co-orientador: Hélio Langoni

Assunto CAPES: 50501038

1. Ovino - Doenças - Diagnóstico. 2. Ovino – Leptospirose – Estado de São Paulo. 3. Reação em Cadeia pela Polimerase.

Palavras-chave: Cultivo; Leptospirose; Ovinos; PCR; SAM.

Nome do Autor: Priscila Barbante

Título: ISOLAMENTO E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA *Leptospira* spp. EM AMOSTRAS RENAIIS E HEPÁTICAS DE OVINOS SOROLOGICAMENTE POSITIVOS E NEGATIVOS PARA LEPTOSPIROSE, ABATIDOS EM FRIGORÍFICO, PROCEDENTES DO EATADO DE SÃO PAULO

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Dra. Simone Baldini Lucheis
Presidente e Orientadora
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Professor Adjunto Dr. Paulo Francisco Domingues
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Professora Assistente Dra. Márcia Marinho
Membro Titular
Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal
FOA - Curso de Medicina Veterinária – UNESP – Araçatuba/SP

Professor Adjunto Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Membro Suplente
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Professor Dr. Raul José Silva Gírio
Membro Suplente
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
FCAV – UNESP – Jaboticabal/SP

Data da Defesa: 08 de julho de 2010.

Dedicatória

Dedicatória

A meus pais Waldemar Barbante e Rosemary Luiz Barbante que são o alicerce de minha vida e que sempre me incentivaram a buscar o conhecimento. Sem eles esta conquista não seria possível.

A ELES OFEREÇO ESTA CONQUISTA!

Agradecimientos

Agradecimentos

A Deus pela força espiritual que de forma muito especial vem agindo em minha vida, guiando-me por caminhos que me levam a alcançar meus objetivos.

A minha família pelo amor incondicional e alicerce constante que sempre me proporcionaram, apoio, incentivo e confiança em todas as etapas de minha vida. Sem o esforço deles esta conquista não se concretizaria

Ao meu namorado Fabio Hiroto Shimabukuro por todo o amor, companheirismo e amizade, pelo conhecimento científico compartilhado, por acreditar em mim, sempre me apoiando e incentivando a seguir em frente, pela paciência oriental nos momentos de irritação e ansiedade, sem ele não teria chegado ao fim.

A minha orientadora Simone Baldini Luccheis pelo incentivo inicial na realização do mestrado e orientação. Ao Prof. Hélio Langoni, pela co-orientação e por ceder suas instalações para realização de parte do trabalho.

A eles muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Carlos Padovani, pelos resultados estatísticos deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, que me auxiliaram todas as vezes em que eu precisei, sempre dispostos a contribuir na minha formação.

Ao frigorífico que autorizou a entrada para as coletas das amostras biológicas.

Em especial a Doroti, Fernanda, Rafael, Jacaré, Rose e Neto que foram fundamentais nesta pesquisa.

A FAPESP pelo apoio financeiro, sem este apoio, não chegaria a este resultado.

A APTA por permitir que parte do trabalho fosse desenvolvida, pelo bom convívio com todos em especial ao Luizão, a Simone e a todos que quando sempre precisei estavam pronto em me ajudar.

A todos os funcionários do departamento, sempre muito agradáveis prestativos, que em algum momento deste trabalho tiveram seu envolvimento por menor que tenha sido.

Aos residentes que sempre muito atenciosos, dispostos em me ajudar sempre que precisava e pelo conhecimento compartilhado com todos, que passaram ou estão na residência.

A todo o “pessoal” da pós Dulce, Haroldo, Patrícia, Ana Paula, Tati, Amanda, Simone, Diego (tocha), Marcela, Leila, Camila (melete), por todas as vezes que precisei de auxílio ou nos momentos de descontração.

A Marta por participar diretamente em minha vida pessoal e profissional, por todas nossas conversas que me ajudou a ser uma pessoa melhor, por todo seu conhecimento compartilhado.

Agradecimento em especial ao Rodrigo por também participar diretamente em minha vida pessoal por ser um super amigo, um grande profissional, uma pessoa inteligentíssima, sempre disposto a me ajudar e pelos momentos agradáveis de descontração que vivemos.

A Dulce e ao Daniel, pessoas maravilhosas que não tenho palavras o suficiente para descrevê-los, que com toda a atenção e preocupação, sempre dispostos a me ajudar sem medir esforços em tudo que precisei.

A Dani pela disponibilidade constante em me ajudar com a preparação de material, pelas conversas e muitas risadas e “fofocas”.

Um agradecimento em especial ao Tocha (Diego), a Leila e a Virgínia, pela paciência em me ajudar em tudo o que precisei em especial na formatação da dissertação.

A todos aqueles que algum momento passou pela minha vida, deixando sempre palavras de amizade, incentivo e em alguns casos saudades.

Muito obrigada!!!

Lista de

Quadros e Tabelas

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	Distribuição dos ovinos segundo a propriedade, sexo e idade. Botucatu/SP, 2010.....	35
QUADRO 2	Municípios de procedência dos ovinos abatidos e pesquisados para leptospirose pelas técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM), cultivo em meio de Fletcher® e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp. Botucatu/SP, 2010.....	36
TABELA 1	Relação das 13 propriedades que apresentaram ovinos reagentes à técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para leptospirose, dentre as 20 testadas. Botucatu/SP, 2010.....	44
TABELA 2	Distribuição de sorovares de <i>Leptospira</i> spp. em 23 ovinos reagentes à técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e respectivos sorovares, títulos de anticorpos e propriedades estudadas. Botucatu/SP, 2010...	47
TABELA 3	Distribuição de sete ovinos positivos à cultura em meio de Fletcher®, segundo o órgão examinado e propriedade de origem. Botucatu/SP, 2010.....	48
TABELA 4	Distribuição de 12 ovinos positivos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp. segundo o órgão examinado e procedência. Botucatu/SP, 2010.....	50
TABELA 5	Resultados obtidos das técnicas diagnósticas, em relação à procedência e animais estudados. Botucatu/SP, 2010.....	52
TABELA 6	Cruzamento entre todas as variáveis diagnósticas utilizadas: cultivo de fígado, cultivo de rim, sorologia, PCR de fígado e PCR de rim. Botucatu/SP 2010.....	53
TABELA 7	Proporção de concordância das respostas segundo o cruzamento de interesse. Botucatu/SP, 2010.....	54
TABELA 8	Resultados de cultura de <i>Leptospira</i> spp. a partir de fragmentos hepáticos de 100 ovinos procedentes de 20 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, segundo à técnica Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp. Botucatu/SP, 2010.....	54

TABELA 9	Resultados de cultura de <i>Leptospira</i> spp. a partir de fragmentos renais de 100 ovinos procedentes de 20 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, segundo à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp. Botucatu, 2010.....	55
TABELA 10	Resultados dos 100 ovinos procedentes de 20 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, sorologicamente positivos e negativos, frente ao cultivo de fragmentos de fígado e rim. Botucatu/SP, 2010.....	55
TABELA 11	Resultados dos 100 ovinos procedentes de 20 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, sorologicamente positivos e negativos, frente à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp. em fragmentos de fígado e rim. Botucatu/SP, 2010.....	56

Lista de
Gráficos e Figuras

LISTA DE GRÁFICO E FIGURAS

GRÁFICO 1	Distribuição em porcentagem dos sorovares reagentes a prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para leptospirose em soros de ovinos procedentes de municípios do Estado de São Paulo. Botucatu/SP, 2010	45
FIGURA 1	Localização geográfica dos municípios do Estado de São Paulo. Local de origem das 20 propriedades de ovinos destinados ao abate. Botucatu/SP, 2010 www.tupa.sp.gov.br/planejamento/?:=mapas&tt=atd	37
FIGURA 2	Distribuição em porcentagem, dos sorovares reagentes à prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para leptospirose, em 23 soro de ovinos procedentes de diferentes municípios do Estado de São Paulo. Botucatu/SP, 2010.....	42
FIGURA 3	Produto de amplificação a partir dos fragmentos de fígado e rim de 12 ovinos, pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp. de oito diferentes propriedades localizados no Estado de São Paulo.....	51

Lista de
Abreviaturas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - por cento

APTA – Agência Paulista dos Agronegócios

CEEA – Câmara de Ética em Experimentação Animal

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNAses – enzimas degradadoras de DNA

dNTPs – desoxinucleotídeos-trifosfatos

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

et al. – e colaboradores

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g – força da gravidade

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Ig M – Imunoglobulinas M

Ig G – Imunoglobulinas G

L. – *Leptospira*

LDZ – Laboratório de Diagnóstico de Zoonose

EMJH – Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

M – Molar

mg – miligrama

mL – mililitro

µL – microlitro

µg - micrograma

µm - micromol

mmol – milimol

n/nº - número

MG – Minas Gerais

NUPEZO – Núcleo de Pesquisa em Zoonoses

°C – graus Celsius

OIE – Organização Internacional de Epizootias

OMS – Organização Mundial da Saúde

p. - página

pb – pares de bases

PBS – Phosphate buffer saline (solução salina tamponada)

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

pH – unidade de acidez/alcalinidade

PM – peso molecular

PIB – Produto Interno Bruto

pmol – picomol

RPM – rotação por minuto

RNAses- enzimas degradadoras de RNA

SAM – Soroaglutinação Microscópica

SAA – Secretaria da Agricultura e Abastecimento

SP – São Paulo

spp. – espécies

Taq – *Termus aquaticus*

TBE – Tampão tris Borato – EDTA

TNE – Tris NaCl EDTA

TRIS – Tris (hidroxil)- amino-metano

UNESP – Universidade Estadual Paulista

X – vezes

Sumário

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Autorização para realização do estudo.....	34
4.2. Locais de execução dos procedimentos laboratoriais.....	34
4.3. Animais.....	34
4.4. Colheita de amostras biológicas.....	38
4.4.1. Sangue.....	38
4.4.2. Fígado e Rim.....	38
4.5. Exames Realizados.....	38
4.5.1. Soroaglutinação microscópica (SAM).....	38
4.5.2. Cultura em meio de Fletcher®.....	39
4.5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp.....	40
4.5.3.1. Preparo das amostras para extração de DNA.....	40
4.5.3.2. Extração e Purificação do DNA.....	40
4.5.3.3. Amplificação do DNA.....	40
4.5.3.4. Eletroforese.....	41
4.6. Controles.....	41
4.7. Sensibilidade Analítica.....	41
4.8. Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS	44
5.1. Sorologia – Soroaglutinação microscópica (SAM).....	44
5.2. Cultura em meio de Fletcher®.....	48

5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp.....	49
5.4. Relação entre as técnicas utilizadas.....	47
6. DISCUSSÃO	58
6.1. Sorologia – Soroaglutinação microscópica (SAM).....	58
6.2. Cultura em meio de Fletcher®.....	61
6.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp.....	62
6.4. Resultados entre as técnicas utilizadas.....	62
7. CONCLUSÕES	67
8. REFERÊNCIAS	69
9. Anexos	80
10. Apêndice	85
11. TRABALHO CIENTÍFICO	90

Resumo

BARBANTE, P. **Isolamento e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. em amostras renais e hepáticas de ovinos sorologicamente positivos e negativos para leptospirose, abatidos em frigorífico, procedentes do Estado de São Paulo.** Botucatu, 2010. 119p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Nos últimos anos a ovinocultura reapareceu na região Sudeste, principalmente no estado de São Paulo, como solução econômica para os pecuaristas. Entretanto, havendo um estado sanitário deficiente na criação, pode-se haver a instalação de doenças nos rebanhos e diminuição na produção, como ocorre na leptospirose, uma das zoonoses mais representativas. Com o intuito de estudar a presença de *Leptospira* spp. nos rebanhos ovinos, foram colhidas 100 amostras sanguíneas e os respectivos fragmentos de fígado e rim dos animais de 20 diferentes propriedades, durante o abate em um frigorífico da região de Sorocaba/SP. Pela prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) obteve-se 23 amostras sorológicas positivas (23%) para um ou mais sorovares de *Leptospira* spp., com prevalência do sorovar Autumnalis. Para a pesquisa do agente em fragmentos de fígado e rim, 100 amostras de cada tecido foram cultivadas em meio de Fletcher, obtendo-se oito (4%) amostras positivas, sendo quatro para rim e quatro para fígado. Destes, cinco animais apresentaram sorologia positiva (um animal positivo simultaneamente para fígado e rim) e dois negativos. Com a prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. houve positividade em 14 (7%) amostras, sendo sete de rim e sete de fígado. Destes, dez eram animais positivos sorologicamente (dois animais positivos simultaneamente para fígado e rim) e dois negativos. Em relação a técnica de cultivo em meio de Fletcher®, a prova PCR demonstrou-se mais rápida, prática e sensível na detecção de leptospira. Pelos resultados obtidos ressalta-se a importância da espécie ovina no contexto epidemiológico da leptospirose.

Palavras chave: Cultivo, Leptospirose, Ovinos, PCR, SAM.

Abstract

BARBANTE, P. Isolation and Polymerase Chain Reaction (PCR) of *Leptospira* spp. in renal and liver samples from serologically leptospirosis positive and negative ovine from an abattoir serving São Paulo State, Brazil. Botucatu, 2010. 119p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

ABSTRACT

In recent years, sheep farming has reappeared in the Southeast region. However, having a deficient sanitary state, disease can appear in flocks and production reduce, which occurs with leptospirosis. With the aim of studying *Leptospira* spp. in sheep herds, 100 blood samples and respective kidney and liver fragments were collected from animals from 20 different properties during slaughter at a meat company in the Sorocaba region, SP, Brazil. The microscopic agglutination test (MAT) found 23 serologically positive samples for one or more *Leptospira* spp. serovars, with an antileptospire antibody occurrence rate of 23% and more significantly for the Autumnalis serovar. To study the agent in the liver or kidney, 100 samples of each tissue were submitted to culture in Fletcher medium using the Pasteur pipette method and analysed by the Polymerase Chain Reaction test, obtaining 12 positive animals considering both agent detection techniques. The *Leptospira* spp. cultures presented eight positive samples (four kidney and four liver), corresponding to five animals with positive serology (one animal simultaneously positive for both kidney and liver) and two negatives. PCR detected *Leptospira* in 14 samples (seven kidney and seven liver) corresponding to 12 positive animals (two animals simultaneously positive for kidney and liver), of these, ten were serologically positive and two negative. PCR was faster, more practical and sensitive than culture for detecting leptospire. Our results stress the importance of ovine specie in the epidemiological context of leptospirosis, acting as disease reservoirs and carriers for the environment and for rural and meat process workers.

Keywords: Leptospirosis; Ovine; MAT; Culture; PCR.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a ovinocultura reapareceu na região Sudeste do Brasil, principalmente no estado de São Paulo, como solução econômica para os pecuaristas de pequeno e médio porte. A atividade despertou maior atenção de governantes, técnicos e produtores, acarretando mudanças significativas em alguns segmentos desta atividade, podendo-se destacar a intensificação da pesquisa voltada para a produção de animais e beneficiamento de seus produtos, crescimento do nível de organização dos produtores, aumento da absorção de novas tecnologias, maior atuação dos agentes financeiros para facilitar o acesso ao crédito e, o mais importante, aumento da demanda por produtos derivados de ovinos (CARVALHO, 2006).

O rebanho brasileiro de ovinos é de aproximadamente 17 milhões de cabeças, segundo análise do Instituto FNP. Estes dados nos mostram que a ovinocultura está em franca expansão em praticamente todo o país, expandindo-se para as regiões onde não havia tradição na exploração econômica desses animais, apontando um cenário em que a tendência da atividade é aumentar a sua importância e sua efetiva participação no produto interno bruto (PIB) do agronegócio brasileiro (MARTINS, 2007).

Tem-se verificado ainda não só um aumento no efetivo dos rebanhos, mas também, no número de propriedades envolvidas nesta atividade. De acordo com especialistas, a principal causa é o aumento na demanda de carne ovina consumida, mais especificamente da carne de cordeiro, observada nos centros de maior consumo, como a região da Grande São Paulo e, ainda, em cidades de maior porte do interior, tais como Campinas, Ribeirão Preto, Sorocaba, Bauru e São José do Rio Preto (OVINOS, 2006).

É evidente o potencial de crescimento econômico que esta atividade pode atingir futuramente, considerando que o Brasil apresenta grande extensão territorial e condições climáticas adequadas à criação de ovinos, produzindo carne de qualidade, com preços atrativos, que pode atender não apenas ao mercado interno, mas também ao externo, gerando empregos e renda a toda a cadeia produtiva de carne ovina (SIMPLÍCIO e SIMPLÍCIO, 2006).

Com a sensibilização dos produtores para a necessidade de trabalhar em conjunto para viabilizar a atividade, o setor tem-se organizado para tornar a atividade competitiva no mercado e buscar um produto de qualidade. Entretanto, um estado sanitário deficiente na criação, juntamente com a ausência ou uso inadequado de tecnologias, pode levar a uma baixa produção e instalação de doenças nos rebanhos, sendo a comercialização da carne destes animais um risco à saúde pública (SIMPLÍCIO e SIMPLÍCIO, 2006).

Uma das enfermidades mais representativas no tocante às doenças de caráter zoonótico, com grande importância econômica nos animais de produção é a leptospirose, doença infecto-contagiosa que ocasiona queda na produção de leite, abortamentos e baixa fertilidade. Além disso, constitui sério problema para saúde pública e está relacionada às características sócio-econômicas, às enchentes e também aos aspectos ocupacionais em humanos (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

As leptospiros são microrganismos pertencentes à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. O gênero era somente dividido em duas espécies, segundo reações sorológicas mais ou menos específicas em: *L. biflexa*, constituído de sorovares não patogênicos de comportamento saprófita e *L. interrogans*, agrupando todos os sorovares patogênicos (FAINE, 1982).

Em 2007, na reunião do Subcomitê de Taxonomia da Leptospiraceae realizada no Equador, *L. interrogans* foi reclassificada em 13 espécies patogênicas de *Leptospiras*: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffi*, distribuídas em mais de 260 sorovarietades agrupadas em 23 sorogrupos (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

As espiroquetas são bactérias gram-negativas que se apresentam como espirais delgadas, móveis, flexíveis, unicelulares, medindo de 0,1 a 0,3µm de diâmetro e 6 a 20µm de comprimento. A parede externa da célula bacteriana é composta por membrana completamente coberta de flagelos periplasmáticos que compõe o filamento axial ou endoflagelo, o qual permite movimentos de saca-rolhas “spin” e de flexão-extensão, facilitando a mobilidade bacteriana no ambiente (QUINN et al., 1994). São aeróbicos obrigatórios e em cultivos desenvolvem-se com relativa lentidão. A multiplicação ocorre em torno de sete a 12 horas (BADKE, 2001).

O cilindro helicoidal (corpo celular) consiste de material nuclear, citoplasma, membrana citoplasmática e a porção de peptidoglicano da parede celular. O flagelo periplasmático é envolvido pelo cilindro e está no espaço periplasmático celular. A porção final de cada flagelo está inserida próxima a um pólo de cilindro protoplasmático firmemente aderido por estruturas denominadas discos de inserção. O ponto distal de cada flagelo se estende para o centro da célula e pode se sobrepor por flagelos originados no pólo oposto (QUINN et al., 1994; LEVETT, 2001).

As leptospiros são sensíveis ao ressecamento, congelamento, salinidade da água e variação de pH. A bactéria é inativada em pH inferior a 6 ou superior a 8, temperaturas ambientais inferiores a 7°C ou superiores a 36°C

(RADOSTITS et al., 2007), ao calor úmido 121 °C por no mínimo 15 minutos e à pasteurização (OIE, 2006). Podem ser inativadas pelo hipoclorito de sódio 1%, álcool etílico a 70%, glutaraldeído, formaldeído, detergentes e pelos ácidos (OIE, 2006).

A leptospirose é uma das zoonoses mais difundidas mundialmente. Ocorre em países desenvolvidos e emergentes, assumindo importância global devido aos grandes surtos que são relatados em todo o mundo. Atualmente é reconhecida como doença infecciosa re-emergente. Compreender sua epidemiologia é uma das etapas fundamentais para a adoção de medidas preventivas que conseqüentemente diminuirão o risco da transmissão (ZAVITSANOU e BABATSIKOU, 2008).

A incidência é significativamente mais elevada em países de clima quente (tropicais) do que em regiões temperadas. Isto se deve principalmente pela sobrevivência prolongada das leptospirosas em ambientes quentes e úmidos. Além disso, na maioria dos países tropicais em desenvolvimento há maior oportunidade de exposição da população humana aos animais infectados (animais domésticos, de produção ou silvestres) (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003) e ambientes contaminados, principalmente em períodos chuvosos (verão). A sua maior ocorrência também está relacionada às regiões pobres com deficiência no saneamento básico, que permite a proliferação de roedores domésticos e contato com águas contaminadas.

Os animais infectados são classificados em hospedeiros definitivos ou de manutenção (reservatórios), aos quais se atribui a persistência do ciclo enzoótico ou como hospedeiros incidentais (RADOSTITS et al., 2007).

Cada sorovar tem seus hospedeiros preferenciais, porém uma espécie animal pode albergar um ou mais sorovares (BADKE, 2001). O hospedeiro de manutenção tem maior suscetibilidade à infecção, desenvolver a infecção crônica nos túbulos renais. Assim, a excreção urinária (leptospiúria) poderá ser intermitente ou contínua.

No ecossistema rural e urbano os roedores sinantrópicos desempenham o papel de principais reservatórios da doença, pois albergam a *Leptospira* nos rins, eliminando-as vivas pela urina no meio ambiente, que contamina água, solo e alimentos. Dentre os roedores sinantrópicos comensais (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*), *Rattus norvegicus* merece

destaque, pois é portador clássico do sorovar Icterohaemorrhagiae, o mais patogênico ao homem (FUNASA, 2002; SHIMABUKURO, 2003). Nesta condição, a relação hospedeiro-parasita revela uma condição de equilíbrio nas qual estes animais usualmente não apresentam nenhum sinal da infecção (BADKE, 2001).

A transmissão ocorre entre os animais e destes para o homem, por mecanismo direto e indireto. Animais e humanos adquirem a infecção a partir de animais infectados, contaminando o pasto, a água e os alimentos com urina, pelos fetos abortados e corrimentos uterinos, contato sexual, inseminação artificial e neonatos viáveis, que podem abrigar a infecção por várias semanas após o nascimento (BHARTI et al., 2003; AVELAR et al., 2004; BHARADWAJ, 2004). A transmissão entre seres humanos é rara (LEVETT, 2001).

A prevalência de diferentes sorovares de *Leptospira* causando doença dentro de uma população depende dos reservatórios animais, como os animais sinantrópicos, domésticos e silvestres, e do sorovar presente, bem como de fatores do meio ambiente, ocupação e práticas agrícolas (BHARTI et al., 2003).

Nos animais de produção, têm sido evidenciadas leptospiros tanto na urina como no sêmen e em secreções vaginais, caracterizando nestas espécies como susceptíveis a doença relacionada à esfera reprodutiva (LILENBAUM et al., 2008). Segundo Corrêa e Corrêa (1992), ovinos são considerados hospedeiros acidentais do sorovar Hardjo por adquirirem a infecção por contato com bovinos doentes. Entretanto, ovinos com altos títulos sorológicos que não apresentaram contato com bovinos doentes apresentaram leptospirúria por até 11 meses.

A ocorrência de *Leptospira* spp. nos ovinos parece ser comum na maioria dos países do mundo, particularmente em rebanhos que utilizam sistemas de manejo extensivo, em que a criação das ovelhas ocorre juntamente com bovinos, possibilitando a infecção pelo contato direto com a urina ou pela água contaminada nos bebedouros coletivos (ELLIS et al., 1983; ELLIS, 1994).

Gordon (1980) e Hathaway (1981) concluíram que, apesar dos ovinos apresentarem certa resistência ao estado de doença, infectavam-se por *Leptospira* spp. pelas águas e pastagens contaminadas, principalmente pelo sorovar Hardjo importante na criação de bovinos e, uma vez estabelecida a

infecção, os animais atuavam como hospedeiros, portadores e eliminadores da bactéria na urina por mais de dois meses.

A epidemiologia da leptospirose em ovinos é complexa e a bactéria pode infectar grande número de animais do rebanho. Entretanto, pode tornar-se endêmica para pequeno número de sorovares, estando relacionada àqueles mais adaptados aos ovinos (ELLIS, 1994).

O microrganismo penetra no organismo do hospedeiro ao entrar em contato diretamente com a urina ou tecidos infectados, ou indiretamente pela água ou solo contaminado, podendo ocorrer também pela pele intacta após imersão prolongada na água. A infecção ocorre principalmente através da pele lesionada por cortes ou abrasões, ou por membranas mucosas, tais como: nasofaríngea, bucal, genital ou conjuntival. A inalação de água ou aerossóis pode resultar em infecção através das mucosas do sistema respiratório. As leptospiras são altamente patogênicas em virtude da produção de enzimas citolíticas, endotoxinas de atividades reduzida e pela multiplicação no endotélio dos vasos (LEVETT, 2001; ZUNINO e ROLLANDO, 2007).

Após a invasão tecidual, as leptospiras difundem-se rapidamente na circulação sanguínea, multiplicando-se ativamente no interstício e nos humores orgânicos como sangue, linfa e líquido, caracterizando quadro agudo e septicêmico (leptospiremia), disseminando-se em seguida aos diferentes órgãos ou sistemas, produzindo diferentes manifestações clínicas (ZUNINO e ROLLANDO, 2007) .

A fase de leptospiremia ocorre entre um a sete dias da infecção e cessa com o aparecimento de anticorpos circulantes. Em seguida, há migração e persistência das leptospiras nos tecidos, especialmente nos túbulos renais proximais, onde podem persistir por semanas a anos, ou persistindo em certos hospedeiros por toda sua vida. A persistência por longos períodos resulta nas lesões renais e, no caso do trato genital das fêmeas, este representa local privilegiado, no qual o agente fica protegido da imunidade humoral (RADOSTITS et al., 2007).

A patogênese da forma subaguda assemelha-se a forma aguda com exceção de que a reação é mais branda. Acomete todas as espécies, embora seja mais comum em bovinos e eqüinos. A forma crônica ocorre em animais convalescentes após a forma aguda e está associada com danos renais e

hepáticos, que prejudicam o crescimento do animal. Já a localização das leptospiplas no trato reprodutivo resulta em infecção da placenta. Na infecção aguda do feto e, ocasionalmente na leptospirose congênita, ocorrem abortamentos, natimortos e nascimento de animais fracos. Após a expulsão do feto, pode haver eliminação de leptospiplas pelas descargas uterinas e a persistência da bactéria nas tubas uterinas por até 22 dias após o parto (RADOSTITS et al., 2007).

Por ser uma doença de curso agudo a crônica, a maioria dos casos em ovinos cursa de forma assintomática (GOMES, 2009; ADLER e DE LE PEÑA MOCTEZUMA, 2010), provavelmente em virtude da infecção do animal por um sorovar adaptado ao hospedeiro. Alguns autores consideram que os ovinos atuam como hospedeiros acidentais, infectando-se por sorovarietades comumente encontradas em outros animais domésticos e silvestres encontrado na região (ELLIS, 1994).

Os sinais clínicos são relacionados frequentemente a doença renal e hepática ou à deficiência reprodutiva. A leptospirose em ovinos é similar à doença em bovinos. É caracterizada por febre, anorexia, icterícia intensa, hemoglobinúria, anemia, sinais nervosos e ocasionalmente morte (PUGH, 2004).

Problemas reprodutivos podem ocorrer como abortamento no terço final da gestação, nascimento de cordeiros fracos, natimortos e a infertilidade. Desta forma, têm causado impacto econômico para a agropecuária, com alta mortalidade nos rebanhos, abortamentos, natimortos, infertilidade e redução na produção de leite (BHARTI et al., 2003; OIE, 2006).

Na leptospirose aguda os ovinos apresentam quadro septicêmico, incluindo febre, apatia, dispnéia, intolerância ao exercício, fraqueza e morte (CEBRA e CEBRA, 2004).

Ellis et al. (1994) constatou que a bactéria determinava aos ovinos uma enfermidade de caráter sistêmico que interfere na reprodução, na lactação das ovelhas e na sobrevivência de cordeiros. A maioria das perdas reprodutivas estava diretamente relacionada aos sorovares Hardjo e Pomona e pequeno número de casos aos sorovares Ballum e Grippotyphosa.

Na infecção aguda, verificou-se que, em ovinos criados em regime de engorda, a infecção pelo sorovar Grippotyphosa foi letal e a deteriorização

física em animais infectados foi a causa principal de perdas. Na forma crônica pôde ocorrer manifestação de perda de massa corpórea. Os abortamentos foram registrados como o único sinal clínico na infecção pelo sorovar Hardjo e na forma aguda da infecção pelo sorovar Pomona. A agalactia foi observada em ovelhas lactantes e manifestações clínicas de encefalite foram devido à presença de leptospiras no tecido nervoso de ovinos. A infecção pelo sorovar Pomona foi a mais comum e a causa principal da maioria da leptospirose clínica em ovinos (RADOSTITS et al., 2007).

As leptospiras são encontradas em todo o mundo, no entanto, certos sorovares parecem ter uma distribuição geográfica limitada. Diversos estudos foram realizados e demonstram que a infecção nessa espécie são comuns, podendo servir como hospedeiro de manutenção, principalmente da Hardjo (COUSINS et al., 1989). Encontra-se na literatura diversos inquéritos sorológicos realizados na espécie ovina em várias localidades do mundo.

Em estudos realizados na Inglaterra e País de Gales os sorovares encontrados foram Autumnalis, Hardjo, Bratislava e Hebdomadis (HATHAWAY et al., 1982). Na Espanha, entre 1970 a 1985, Leon-Vizcaino et al. (1987) relataram a ocorrência de 973 surtos de abortamento em ovinos, dos quais 1,7% eram causados por leptospiras. Em 11 rebanhos de ovinos (64,7%) avaliados no estudo, foi detectado como agente causal o sorovar Pomona; em três rebanhos (17,6%) o sorovar Sejroe; em dois rebanhos pelo sorovar Icterohaemorrhagiae e, em um rebanho, pelo sorovar Grippothyphosa.

Em trabalho realizado por Ahl et al. (1992), nos Estados Unidos, os sorovares encontrados foram Autumnalis, Ballum, Bataviae e Bratislava. Segundo Zamora et al. (1999), no Chile, detectou-se soropositividade de 5,7% e os sorovares encontrados foram Icterohaemorrhagiae, Autumnalis e Hardjo. Na Itália pesquisa realizada por Ciceroni et al. (2000) destacaram os sorovares Castellonis, Sejroe, Hardjobovis, Copenhageni e Cynopteri.

Em estudos feitos em Vojvodina, na Sérvia, analisando-se os abortamentos infecciosos em ovinos, constatou que, cerca de 3,2% eram causados por leptospiras, reforçando a leptospirose como causas de abortamento infeccioso em ovinos (VIDIC et al., 2007).

Dorjee et al. (2008), na Nova Zelândia, analisaram ovinos abatidos em frigorífico, demonstrando-se que o sorovar Hardjobovis foi o mais prevalente e

que os animais sororreagentes apresentaram 21,7 vezes maior probabilidade de resultarem em cultura positiva do que os soronegativos.

A infecção de ovinos foi detectada no Brasil, pela primeira vez, por Santa Rosa e Castro (1963), em animais procedentes do estado de São Paulo, nos quais foram encontrados 34% de animais reagentes para vários sorovares de *Leptospira* spp.

Estudos sorológicos foram realizados posteriormente, por Viegas et al. (1980), na Bahia encontrando-se 22,8% de ovinos reagentes, principalmente para os sorovares Autumnalis, Castellonis, Grippotyphosa e Tarassovi. Em outro trabalho realizado na Bahia, Caldas et al. (1986), observaram 34,7% de ovinos reagentes de uma amostragem de 800 animais examinados, sendo os sorovares mais freqüentes Autumnalis, Castellonis e Butembo. Já Langoni et al. (1995), pesquisaram aglutininas antileptospiras em 356 soros de ovinos de diferentes regiões do Estado de São Paulo, tendo-se encontrado: Icterohaemorrhagiae (51,25%); Castellonis (20,63%), Hardjo (19,36%); Bratislava (16,25%); Andamana e Wolffii (11,88%); Copenhageni (8,75%); Grippotyphosa (4,34%); Pomona (2,5%) e Tarassovi (0,63%).

Pesquisa feita por Favero et al. (2002), em São Paulo, verificaram 0,7% de positividade em soros de ovinos, destacando-se os sorovares Icterohaemorrhagiae, Butembo, Castellonis e Hebdomadis como reagentes.

No Estado do Rio Grande do Sul, foi verificado que, pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), das 1360 amostras de soros testadas, 466 (34,26%) animais foram reagentes e os títulos de aglutininas antileptospiras variavam de 100 a 3200. Os sorovares encontrados foram Hardjo (28,4%), Sentot (16,8%); Hardjoprajitno (14,5%), mostrando que a *Leptospira* spp. está disseminada na maioria das fazendas que criam ovinos nas mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Rio Grande do Sul (HERRMANN et al., 2004).

Azevedo et al. (2004a), no Rio Grande do Norte, verificaram que 3,5% dos animais eram soropositivos, sendo que os sorovares mais prováveis foram Castellonis (57,1%), Autumnalis (28,6%) e Pomona (14,3%). Em anos seguintes Silva et al. (2007), analisaram ovinos abatidos em Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul, observando-se 20,5% de soropositividade para o sorogrupos Autumnalis, Bataviae, Sejroe e Icterohaemorrhagiae em 44 ovinos

pesquisados. Lilenbaum et al. (2009) em pesquisa no Rio de Janeiro relataram que os sorovares de maior importância encontrados foram Hardjo e Shermani.

Em estudo realizado por Escócio et al. (2008), foi analisado o perfil sanitário de rebanhos de ovinos criados exclusivamente ou consorciados com bovinos na região de Sorocaba/SP. Foi verificado que, dentre as enfermidades analisadas, a leptospirose demonstrou grande importância, tendo em vista que todos os rebanhos foram reagentes para pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp., sendo que, em apenas quatro rebanhos de criação exclusiva de ovinos a prevalência foi do sorovar Autumnalis, seguido por Pyrogenes e em sete rebanhos com criação consorciada (ovino/bovino) a prevalência foi do sorovar Icterohaemorrhagiae, Hardjo e Javanica.

Cardoso et al. (2008) determinaram a condição sanitária dos rebanhos de caprinos e ovinos na região sudoeste do Estado de São Paulo, tendo-se verificado que, dos 100 ovinos analisados para leptospirose pela técnica de SAM, 15% foram reagentes, sendo os sorovares mais prevalentes Icterohaemorrhagiae (26,6%), seguido de Pyrogenes, Wolffii e Hardjo (13,3%) e pelo sorovar Bratislava, Castellonis, Canicola e Hardjo (6,6%).

Em estudo realizado no Distrito Federal, por Melo (2010), verificou-se que, de 157 ovinos analisados 3% eram soropositivos, tendo como sorovar reagente o Hardjoprajitno.

Análises realizadas em soros de 334 ovinos de Uberlândia/MG revelaram soroprevalência de 22,2%, tendo-se os sorovares mais frequentes o Hardjo (23,6%), Autumnalis (22,4%), a associação dos sorovares Hardjo e Wolffii (17,9%) e Grippytyphosa (14,4%) (SALABERRY, 2010).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose deve ser baseado nos achados clínico-epidemiológicos, associados aos resultados de exames laboratoriais (BADKE, 2001). Estes podem ser complexos e envolvem exames diretos e indiretos de diagnóstico. Os testes indiretos detectam anticorpos anti-leptospiras e os diretos investigam antígenos de leptospiras ou ácidos nucléicos de leptospiras em tecido de animais ou fluido corporal. A escolha do teste dependerá da espécie animal (teste de rebanho ou teste individual) e do método disponível na região (OIE, 2006).

Na fase aguda, durante o período febril, as leptospiras podem ser encontradas no sangue, linfa, urina, sêmen, leite e nos líquidos cérebro-

espinhais, torácicos ou peritoneais, bem como em fragmentos de órgãos colhidos por ocasião de necropsia (fígado, rim, pulmão) e em produtos de abortamento (feto e placenta) (BRASIL, 1999). Para tentativa de visualização das leptospiras, podem ser realizadas as técnicas de exame direto em microscopia de campo escuro; provas tintoriais como a impregnação pela prata (Levaditi, Fontana-Tribondeau) e a imunofluorescência direta (OIE, 2006). Outros métodos incluem a técnica de isolamento por cultivo em meio semi-sólido de Fletcher ou o isolamento por inoculação em animais de laboratório (hamster ou cobaia jovem) (VASCONCELLOS, 1979). Todas estas técnicas são laboriosas e usualmente aplicam-se em casos individuais ou para animais de alto valor econômico (BRASIL, 1999).

Técnicas mais atuais para pesquisa de leptospiras em fluidos têm empregado os testes de ELISA ou imunohistoquímica. Os resultados obtidos com estas técnicas ampliam a capacidade de detecção das leptospiras íntegras ou fragmentadas, pois o agente é detectado com auxílio de anticorpos específicos marcados com enzimas como a peroxidase ou com fluoresceína (SAGLAM, 2008; GOMES, 2009).

Os testes sorológicos são os mais comumente utilizados como métodos de diagnóstico para a leptospirose. O teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) é considerado padrão-ouro no diagnóstico e o método de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) (FAINE, 1982). Consiste na utilização de culturas de bactérias vivas como antígeno, utilizando sorovares representativos de acordo com o conhecimento epidemiológico regional (GALTON et al., 1965; COLE et al., 1973).

O teste de SAM é capaz de detectar anticorpos, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença, e o título 100 é comumente aceito como ponto de corte. Esta técnica é utilizada principalmente no diagnóstico da doença provocada por sorovares acidentais, os quais não estão adaptados ao hospedeiro ou em casos da doença aguda, causadas por sorovares adaptados ao hospedeiro. O teste tem menor utilidade no diagnóstico da doença crônica em hospedeiros de manutenção, já que a resposta dos anticorpos à infecção pode ser reduzida na infecção crônica ou persistir em infecções subclínicas (OIE, 2006).

As provas sorológicas apresentam certa dificuldade quanto à interpretação de resultados, em virtude da limitação na determinação dos sorovares infectantes em estudos epidemiológicos, devido às reações cruzadas. No diagnóstico sorológico, o sorovar infectante e a condição clínica envolvida devem ser considerados. Animais infectados podem abortar ou serem portadores renais ou genitais com títulos menores que 100 na SAM. Tal fato ocorre devido aos níveis de anticorpos séricos declinarem até os valores indetectáveis em animais com infecções persistentes (OIE, 2006).

A primeira resposta sorológica relacionada à infecção é a produção de imunoglobulina M (IgM), que aumenta rapidamente, mas declina até as concentrações indetectáveis por volta da quarta semana após a infecção. Em uma ou duas semanas de infecção aparecem as imunoglobulinas G (IgG), as quais após três meses constituem-se em 80% dos anticorpos detectados pelo teste de SAM. O título da SAM atinge pico entre 11 a 21 dias após a infecção, podendo variar na titulação de 3200 a concentrações indetectáveis. O título da SAM declina gradualmente durante cerca de 11 meses, mas a persistência é variável (RADOSTITS et al., 2007).

Outra preocupação é a inabilidade da SAM em diferenciar títulos de anticorpos após a vacinação, de títulos que se formam após a infecção natural, já que estes títulos podem ser semelhantes. Entretanto, os títulos de anticorpos após a infecção são mais elevados e persistem por maior período comparado aos títulos pós-vacinais. Além disso, animais vacinados contra leptospirose podem ter anticorpos contra os sorovares presentes na vacina. Portanto, é importante considerar o histórico de vacinação dos animais testados. A vacinação difundida contribui significativamente no número de animais soropositivos e pode mascarar a presença da infecção crônica no rebanho (OIE, 2006).

A cultura de leptospiros de fluidos e tecidos corporais tem sido indicada, mas esta técnica pode levar mais de seis meses, é muito laboriosa e apresenta baixa taxa de isolamento (OLIVEIRA, 1994). Por outro lado, o isolamento do microrganismo de portadores renais é muito útil em estudos epidemiológicos para determinar quais sorovares estão presentes em uma espécie animal e, em particular, em um grupo de animais ou em determinada localização geográfica (ELLIS, 1992).

A leptospirose, além de doença relacionada às condições ambientais e sócio-econômicas, tem forte caráter ocupacional. Azevedo et al. (2004b) alertaram para a transmissão da doenças em trabalhadores de abatedouros pela manipulação de órgãos e carcaças de animais infectados.

No Brasil há poucos relatos a respeito de isolamentos de leptospira em ovinos, demonstrando a importância desta espécie no contexto epidemiológico da leptospirose. Na tentativa de isolamento de leptospiras de rins de ovinos abatidos em matadouro do município de Patos, no estado da Paraíba, Azevedo et al. (2004b) utilizaram 80 animais sem sinais clínicos aparentes de leptospirose e obtiveram o isolamento de *Leptospira* spp. de quatro amostras de tecido renal pela técnica de pipeta Pasteur, indicando-os como possíveis fontes de infecção do agente, expondo os magarefes à infecção.

Em estudo realizado por Silva et al. (2007), em ovinos abatidos em Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul, foi obtido o isolamento de *Leptospira noguchii*, do sorogrupo Autumnalis, sendo o primeiro relato feito no Brasil dessa espécie em ovinos, destacando a importância desses animais como possíveis reservatórios de leptospiras patogênicas e a sua implicação à saúde pública.

Para a determinação da ocorrência da leptospirose infecção ou doença, indica-se a associação de métodos diagnósticos, baseado na combinação de provas sorológicas e bacteriológicas para o isolamento (LARSSON et al., 1984), entre outros disponíveis, como a imunohistoquímica ou, mais recentemente, provas envolvendo biologia molecular para a pesquisa do DNA do agente.

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada como método diagnóstico capaz de detectar leptospiras e outros microrganismos em amostras biológicas, tais como urina (LILENBAUM et al., 2009), líquido (MÉRIEN et al., 1992), leite (BALAKRISHNAN et al., 2009), sêmen e fluido vaginal (LILENBAUM et al., 2008), humor aquoso (FABER et al., 2000) e ovócitos (MAGAJEVSKI, 2007).

A PCR é uma alternativa diagnóstica, por ser um teste rápido e além disso, evita a necessidade de manipulação frequente de bactérias viáveis e, baseado na amplificação de um segmento de DNA da leptospira, tem a

possibilidade de melhorar a sensibilidade das técnicas diagnósticas em fase precoce da infecção e/ou doença (SHIMABUKURO, 2003).

Outra vantagem da técnica de PCR decorre do fato de não ser necessária a viabilidade dos patógenos para a realização da mesma, o que permite a inativação e o armazenamento das amostras, bem como de sua aplicação em amostras mal conservadas (GINGERAS et al., 1990).

Em pesquisa realizada por Magajevski e Gírio (2008), na avaliação da sensibilidade da PCR frente a quatro técnicas para extração de DNA de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em sêmen bovino experimentalmente contaminado, relatou-se que a escolha correta do método de extração de DNA é fundamental para o sucesso da pesquisa de patógeno por esta técnica.

Estudos feitos por Lilenbaum et al. (2009), no Rio de Janeiro confirmaram que a técnica da PCR pode ser um método indicado para o diagnóstico de ovinos portadores da leptospirose, na detecção do agente na urina de ovinos, tendo em vista o encontro do agente em seis animais de 40 ovinos analisados. Neste sentido, a utilização de diferentes técnicas diagnósticas em pesquisas epidemiológicas atua complementarmente e podem contribuir significativamente para o estudo do micorganismo.

Portanto, tendo em vista a importância da ovinocultura como um segmento econômico crescente dentro do agronegócio brasileiro, torna-se necessário avaliar o estado sanitário dos rebanhos, em particular em relação à leptospirose, a qual constitui-se em zoonose de extrema importância em saúde pública.

Objetivos

3. OBJETIVOS

- **OBJETIVO GERAL:**

- ✓ Estudar a ocorrência da leptospirose em ovinos abatidos em frigorífico, procedentes de propriedades localizadas em municípios do Estado de São Paulo.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- ✓ Verificar a ocorrência de anticorpos antileptospiras, pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), em ovinos destinados ao abate em frigorífico, procedentes de 20 diferentes propriedades localizadas em municípios do Estado de São Paulo;
- ✓ Verificar a participação de ovinos sorologicamente positivos e negativos, na fase aguda e/ou crônica pela detecção do agente a partir de fragmentos de fígado e rim, empregando-se as técnicas de isolamento em meio de Fletcher® e pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.;
- ✓ Comparar os resultados entre as provas de Soroaglutinação Microscópica (SAM), a detecção de *Leptospira* spp. pela técnica de isolamento em meio de Fletcher® e a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. a partir de fragmentos de fígado e rim.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Autorização para realização do estudo

O presente estudo foi devidamente apresentado a Câmara de ética em experimentação animal da FMVZ – UNESP- Botucatu, tendo sido aprovado em oito de abril de 2008, protocolo, número 95/2008 - CEEA (**Anexo 1**).

As colheitas biológicas dos ovinos foram autorizadas pelos responsáveis do frigorífico onde os animais foram abatidos.

4.2. Locais de execução dos procedimentos laboratoriais

O procedimento de obtenção do soro dos animais e a técnica de cultivo dos fragmentos de fígado e rim em meio de Fletcher® foram realizados no Laboratório de Hepatites Virais e Leptospirose do Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba/SP, com a devida autorização da instituição (**Anexo 2**), devido à proximidade com o frigorífico onde foram coletados os materiais.

As técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e o acompanhamento das leituras dos cultivos em meio de Fletcher® foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal da Unidade de Pesquisa de Bauru/SP, pertencente ao Pólo de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Oeste, órgão vinculado à Agência Paulista Tecnológica dos Agronegócios (APTA), Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SAA).

A prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., foi realizada no Laboratório de Diagnósticos de Zoonoses (LDZ) do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO), Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP – Botucatu.

4.3. Animais

Foram utilizados no estudo, 100 ovinos de diferentes raças, dos quais 53 eram machos e 47 fêmeas. Destes, 65 animais eram jovens (cordeiros) e 35 adultos (**Quadro 1**).

Os animais eram procedentes de 20 propriedades localizadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo (**Quadro 2** e **Figura 1**). Foram

utilizados cinco animais de cada propriedade, constituindo-se em vinte lotes, identificados com letras de A a U.

Todos os animais foram destinados ao abate em um frigorífico localizado em Boituva/SP, onde foram coletadas as amostras biológicas.

QUADRO 1 - Distribuição dos ovinos segundo a propriedade, sexo e idade. Botucatu/SP, 2010.

PROPRIEDADE	SEXO		IDADE	
	MACHO	FÊMEA	JOVEM	ADULTO
A	5	0	5	0
B	1	4	5	0
C	4	1	5	0
D	1	4	5	0
E	2	3	5	0
F	2	3	0	5
G	4	1	0	5
H	2	3	0	5
I	5	0	5	0
J	5	0	5	0
L	1	4	5	0
M	0	5	0	5
N	5	0	5	0
O	5	0	5	0
P	0	5	0	5
Q	5	0	5	0
R	3	2	0	5
S	3	2	0	5
T	0	5	5	0
U	0	5	5	0
TOTAL	53	47	65	35

QUADRO 2 – Municípios de procedência dos ovinos abatidos e pesquisados para leptospirose pelas técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM), cultivo em meio de Fletcher® e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. Botucatu/SP, 2010.

PROPRIEDADE	MUNICÍPIO/ESTADO DE PROCEDÊNCIA
A	Piedade/SP
B	Boituva/SP
C	São Manuel/SP
D	Itu/SP
E	Piedade/SP
F	São Sebastião da Gramma/SP
G	Atibaia/SP
H	Atibaia/SP
I	Tabapuã/SP
J	Botucatu/SP
L	Neves Paulista/SP
M	Itapetininga/SP
N	Itupeva/SP
O	Cachoeira Paulista/SP
P	São Miguel Arcanjo/SP
Q	Itapetininga/SP
R	Itu/SP
S	São Sebastião da Gramma/SP
T	Mococa/SP
U	Boituva/SP

4.4. Colheita de amostras biológicas

4.4.1. Sangue

Imediatamente após a fase de sangria, foram colhidos em tubos de vidro estéreis aproximadamente 10 mL de sangue de cada animal. Os tubos foram devidamente identificados com o número de cada animal e acondicionados sob temperatura de refrigeração em caixa isotérmica com gelo reciclável até a chegada ao Laboratório de Hepatites Virais e Leptospirose do Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba/SP. As amostras de sangue foram dessoradas após a retração do coágulo e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Cada amostra de soro obtido foi acondicionada em microtubos de 1,5mL, devidamente identificados e mantidos em freezer a -20°C até o momento da realização da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM).

4.4.2. Fígado e Rim

Durante a linha de abate na fase de evisceração, foram colhidos assepticamente um fragmento do fígado e um dos rins (direito ou esquerdo). Estes foram acondicionados individualmente em sacos plásticos, devidamente vedados e identificados, sob temperatura de refrigeração em caixa isotérmica com gelo reciclável, e encaminhados ao Laboratório de Hepatites Virais e Leptospirose do Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba/SP, para a realização imediata da técnica de cultivo e meio de Fletcher®.

Um fragmento de cada órgão, pesando entre 5 a 50mg, foi acondicionado em microtubos estéreis de 1,5mL livres de DNase e RNase, contendo 1,0 mL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 estéril, para posteriormente serem utilizados para a extração do DNA e posterior Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. os quais foram mantidos em freezer a -20°C até o momento de processamento.

4.5. Exames realizados

4.5.1. Soroaglutinação microscópica (SAM)

A prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi realizada segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1999). Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:50 em solução salina tamponada pH 7,2 como ponto de corte positivo e testada para 29 sorovares de *Leptospira* spp., considerando-se como

positiva aquela que apresentou 50% ou mais de aglutinações em relação ao controle. As amostras positivas ao título inicial foram de 1:100, novamente diluídas sucessivamente na razão dois e testadas para os sorovares que reagiram anteriormente. O título final foi aquele que ainda apresentou 50% ou mais de aglutinação (FAINE, 1982).

Como antígenos, foram utilizados culturas vivas de *Leptospira* spp., mantidas em estufa a 29°C, temperatura ideal para o seu desenvolvimento, com quatro a 14 dias de crescimento, diluídas na proporção 1:3 em solução salina tamponada pH 7,2, e que não apresentassem contaminantes e nem auto-aglutinação. Os 29 sorovares utilizados foram mantidos por repiques semanais em meio de cultura líquido de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), a saber: 1A (Australis), 1B (Bratislava), 2A (Autumnalis), 2B (Butembo), 3 (Castellonis), 4A (Bataviae), 5 (Canicola), 6B (Whitcombi), 7 (Cynopteri), 8A (Djasiman), 8B (Sentot), 9 (Grippotyphosa), 10 (Hebdomadis), 11A (Copenhageni), 11B (Icterohaemorrhagiae), 12 (Javanica), 13 (Panama), 14A (Pomona), 15 (Pyrogenes), 16A (Hardjo), 16B (Wolffi), 17 (Shermani), 18 (Tarassovi), 19 (Andamana), 21 (Patoc), PRA (Hardjoprajitno), MIN (Mini), CTG (HardjoCTG) e BOV (Hardjobovis).

4.5.2. Cultura em meio de Fletcher®

Os fragmentos de fígado e rim utilizados para o cultivo foram processados segundo Passos et al. (1988). Em capela de fluxo laminar, devidamente esterilizada com álcool 70% e sob ação de luz ultravioleta durante 30 minutos, o fragmento hepático, bem como o de rim (um de cada animal) foram submetidos à desinfecção, utilizando-se de álcool iodado a 2% e realizando-se cauterização superficial com espátula de metal. Em seguida, os mesmos foram perfurados com auxílio de pipeta Pasteur estéril. O material obtido foi cultivado em três tubos de meio de cultura Fletcher®, sendo que, dois em meio de Fletcher® acrescido de 100µg de 5-fluorouracil/mL e de 2,5 µg de neomicina e um em meio Fletcher® sem antibiótico, incubados a 28°C a 30°C por 16 semanas. As leituras foram realizadas quinzenalmente após a semeadura, colocando-se 20µL da amostra de meio de cultura de cada tubo entre lâmina e lamínula, considerando-se amostras positivas quando da visualização de espiroquetas móveis em microscopia de

campo escuro, no aumento de 400X, e/ou quando houvesse o desenvolvimento bacteriano com a formação do anel de opalescência.

4.5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

4.5.3.1. Preparo das amostras para a extração do DNA

Os fragmentos de fígado e rim, que estavam armazenados a -20°C em microtubos foram descongelados a temperatura ambiente. Os mesmos foram pré-triturados com o auxílio de pinça e bisturi estéreis e acondicionados em microtubos de 1,5 mL livres de DNase e RNase. Adicionou-se às amostras 1mL de PBS 7,2 estéril e centrifugou-se a 19.000 g por 30 minutos a 4°C, em ambos os fragmentos, segundo Heinemann et al. (2000) com algumas adaptações para lavagem do tecido. Descartou-se o sobrenadante e ao botão celular adicionado-se 50µL de PBS 7,2 estéril. Em seguida, procedeu-se a maceração com o bio-vortexer (Biospec Inc.) e centrifugou-se a 2.000 g por 10 segundos.

4.5.3.2. Extração e purificação do DNA

A partir das amostras de fígado e rins, procedeu-se à extração de DNA utilizando-se o kit **Illustra™ Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®)**, conforme recomendações do fabricante.

4.5.3.3. Amplificação do DNA

Os iniciadores foram descritos por Mérien et al. (1992) os quais amplificam 331pb, como segue:

LEP 1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3')

LEP 2 (5' TTCCCCCATTGAGCAAGATT 3')

A amplificação do DNA foi realizada segundo a adaptação descrito por Mérien et al. (1992). As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL com volumes totais de 25,0µL, sendo 2,5µL de solução tampão de PCR (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0), 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µL de solução de dNTP (0,2mM), 0,5µL de *Taq Platinum* DNA (1U) (Invitrogen®), 0,5µL de cada iniciador (10pM), 17,75µL de água ultrapura e 2µL de DNA da amostra obtida no final da extração a 10ng.

A preparação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), com o seguinte perfil de ciclagem: 94°C por três minutos, 30 ciclos de 94°C por um minuto, anelamento a 63°C por 1 minuto e extensão a 72°C por dois minutos, incluindo-se dez minutos adicionais a 72°C ao final para completar a extensão dos segmentos amplificados.

4.5.3.4. Eletroforese

A visualização dos produtos amplificados foi realizada pela técnica de eletroforese. Para tanto preparou-se gel de agarose a 1,5% adicionado de 1µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®). Foram utilizados 15µL do produto de PCR e como marcador de peso molecular 4µL de 100pb ladder (Invitrogen®). Para todas as amostras foram adicionados 2µL de uma solução de Blue Juice Gel Loading (Invitrogen®). O gel foi submetido a corrida eletroforética em cuba horizontal HE99 (GE-Healthcare) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09m de ácido bórico e 0,001M de EDTA) e a voltagem de 100V por aproximadamente uma hora utilizando a fonte Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE-Healthcare). O gel foi visualizado no transluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema GelDoc-It™ Imaging System foi documentada utilizando-se software Vision Works®LS.

4.6. Controles

Para cada sequência de extração e purificação, foram utilizadas controles positivos e negativos para a técnica Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Para isso foram preparadas suspensões de fígado e rim, contaminadas com *L. interrogans* sorovar Pyrogenes, na concentração de $2,0 \times 10^4$ leptospiras/mL, como controle positivo. Para o controle negativo foi utilizada água ultrapura.

4.7. Sensibilidade analítica

A técnica de extração e purificação, PCR e eletroforese foram testadas nas diferentes amostras de tecido (fígado e rim) sabidamente negativas, através da contaminação das amostras com *L. interrogans* sorovar Pyrogenes, nas concentrações de aproximadamente $2,0 \times 10^0$; $2,0 \times 10^1$; $2,0 \times 10^2$; $2,0 \times 10^3$ e $2,0 \times 10^4$

microrganismos por mililitros de suspensão de cada amostra de órgão (SHIMABUKURO, 2007) (**Figura 2**).

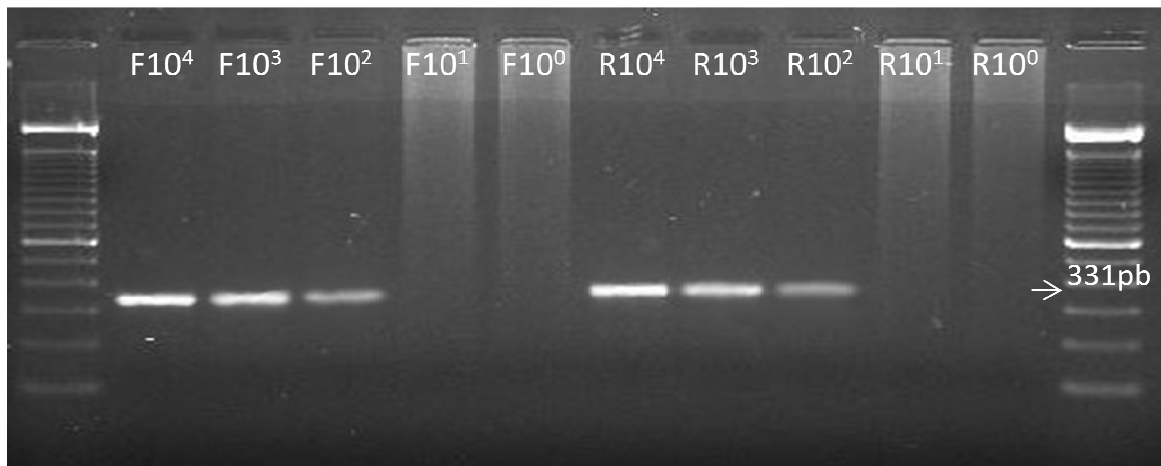


FIGURA 2 – Detecção de DNA de *Leptospira* spp. pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), em amostra de fígado e rim de ovinos contaminada experimentalmente. Botucatu/SP, 2010. Legenda: F10⁴ - Amostra de fígado com 10⁴ leptospiras/mL; F10³ - Amostra de fígado com 10³ leptospiras/mL; F10² - Amostra de fígado com 10² leptospiras/mL; F10¹ - Amostra de fígado com 10¹ leptospiras/mL; F10⁰ - Amostra de fígado com 10⁰ leptospira/mL; R10⁴ – Amostra de rim com 10⁴ leptospiras/mL; R10³ – Amostra de rim com 10³ leptospiras/mL; R10² – Amostra de rim com 10² leptospiras/mL; R10¹ – Amostra de rim com 10¹ leptospiras/mL; R10⁰ – Amostra de rim com 10⁰ leptospira/mL; nas laterais padrão de peso molecular 100 pares de bases (pb) (Invitrogen®).

4.8. Análise estatística

O procedimento utilizado para a análise estatística baseou-se na distribuição de frequências das variáveis, cruzamentos entre as variáveis e teste de proporção de concordância das respostas dicotômicas, considerando o nível de 5% de significância (NORMAN e STREINER, 1994).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Sorologia – Soroaglutinação microscópica (SAM)

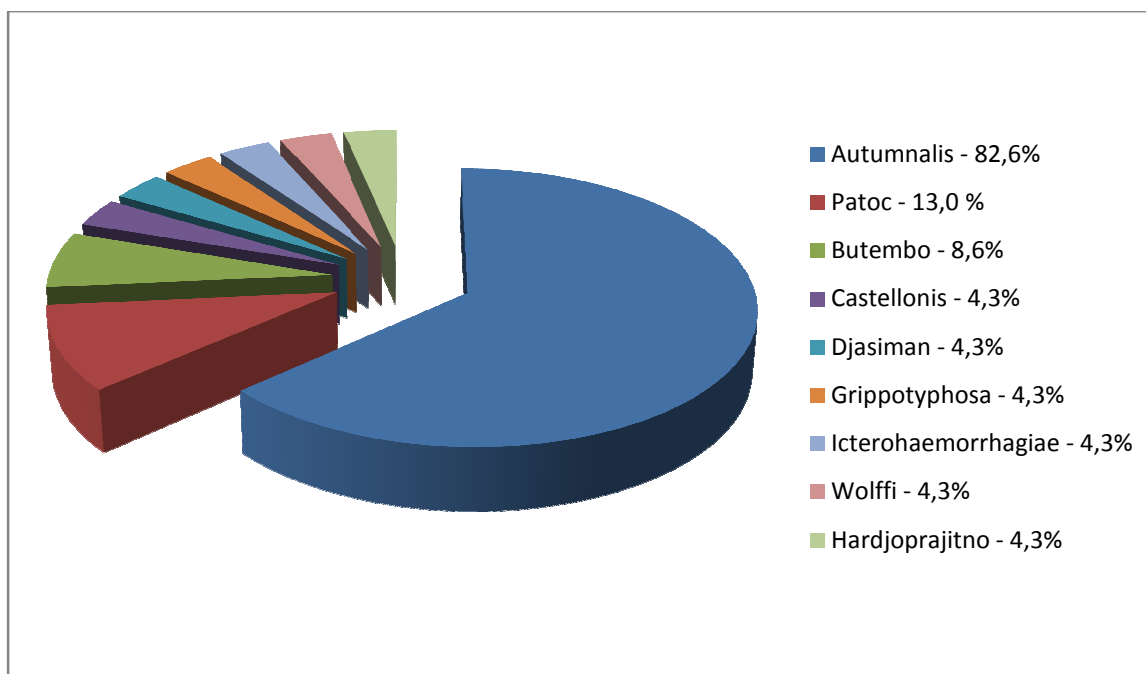
Dentre as 20 propriedades pesquisadas, 13 (65%) apresentaram pelo menos um animal com sorologia positiva. Do total de 100 amostras de soro analisadas pela prova Soroaglutinação Microscópica (SAM), 23 (23%) foram reagentes para um ou mais de um sorovar de *Leptospira* spp. (**Tabela 1**).

TABELA 1 – Relação das 13 propriedades que apresentaram ovinos reagentes à técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para leptospirose, dentre as 20 testadas. Botucatu/SP, 2010.

PROPRIEDADE	Nº DE ANIMAIS/PROPRIEDADE	Nº DE ANIMAIS POSITIVOS
A	5	1
C	5	1
D	5	2
E	5	2
F	5	1
G	5	2
H	5	2
J	5	1
L	5	3
M	5	3
Q	5	1
R	5	1
U	5	3
TOTAL	65	23

Dos 29 sorovares de *Leptospira* spp. testados, apenas nove (31%) foram reagentes. Dezenove animais (82,6%) foram reagentes para o sorovar Autumnalis, com títulos variando de 100 a 1600 (**Tabela 2**). Outros sorovares reagentes foram Butembo (n=2), Castellonis (n=1), Djasiman (n=1), Grippothyphosa (n=1), Icterohaemorrhagiae (n=1), Wolffii (n=1), Patoc (n=3) e Hardjo Prajitno (n=1), com títulos variando de 100 a 200 (**Gráfico 1**). O título maior obtido foi de 1600 para o sorovar Autumnalis, em um único animal.

GRÁFICO 1 – Distribuição em porcentagem, dos sorovares reagentes à prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para leptospirose, em 23 soros de ovinos procedentes de diferentes municípios do Estado de São Paulo. Botucatu/SP, 2010.



Nas propriedades A, C e F, um animal de cada propriedade foi reagente, todos apresentando título 100 para o sorovar Autumnalis. Na propriedade E, dois animais foram reagentes, um apresentando título 200 para sorovar Autumnalis e 200 para Patoc. Já nas propriedades D, G e H, dois animais de cada localidade foram reagentes, com um apresentando título 100 e o outro título 200 para o sorovar Autumnalis.

Na propriedade J, um animal apresentou título 200 para o sorovar Autumnalis. Na propriedade L, três animais foram reagentes, com um apresentando título 100 e outro título 200, ambos para os sorovar Autumnalis. O terceiro animal foi reagente para dois sorovares, com título 200 para Autumnalis e título 100 para Butembo.

Na propriedade M, três animais foram reagentes, com um apresentando título 100 para o sorovar Autumnalis, outro título 200 para o sorovar Wolffi e o terceiro animal reagente para dois sorovares, com título 200 para os sorovares Autumnalis e Patoc.

Na propriedade Q, um animal foi reagente com título 100 para o sorovar Djasiman e, na propriedade R, um animal apresentou título 200 para o sorovar Autumnalis. Já na propriedade U, três animais foram reagentes, com um apresentando título 100 para o sorovar Hardjoprajitno e outro com título 100 para o sorovar Autumnalis e título 100 para o sorovar Castellonis. O terceiro animal foi reagente para cinco sorovares diferentes, com título 1600 para o sorovar Autumnalis, título 100 para o sorovar Butembo, título 100 para Grippothyphosa, título 200 para Icterohaemorrhagiae e título 100 para o sorovar Patoc (**Tabela 2**)

TABELA 2 - Distribuição de sorovares de *Leptospira* spp. em 23 ovinos reagentes à técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e respectivos títulos de anticorpos e propriedades estudadas. Botucatu/SP, 2010.

Propriedade	Animais analisados/ reagentes	Sorovares												
		Autumnalis		Butembo	Castellonis	Djasiman	Grippothyphosa	Icterohaemorrhagiae	Wolffi	Patoc	Hardjo			
		100	200	1600	100	100	100	100	200	200	100	200	100	
A	5/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	5/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	5/2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E	5/2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
F	5/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G	5/2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H	5/2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
J	5/1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L	5/3 ^a	1	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	5/3 ^b	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	
Q	5/1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
R	5/1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
U	5/3 ^c	1	-	1	1	1	-	1	-	1	-	1	-	
TOTAL		9	9	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	

^a Um animal reagente para dois sorovares, Autumnalis (200) e Butembo (100)

^b Um animal reagente para dois sorovares, Autumnalis (200) e Patoc (200)

^c Um animal reagente para dois sorovares, Autumnalis (100) e Castellonis (100) e outro para cinco sorovares, Autumnalis (1600), Butembo (100), Grippothyphosa (100), Icterohaemorrhagiae (200) e Patoc (100)

(-) animais não reagentes

5.2. Cultura em meio de Fletcher®

Dentre os 100 ovinos avaliados, sete (7%) apresentaram cultivo positivo e, dentre as 20 propriedades pesquisadas, cinco (25%) apresentaram ovinos com cultura positiva para leptospirose em pelo menos um animal. Dos 200 fragmentos de fígado e rim submetidos ao cultivo em meio de Fletcher® com ou sem antibiótico, 192 (96%) foram negativos e oito (4%) foram positivos. Destes, quatro (2%) foram positivos apenas em relação aos fragmentos hepáticos (três em cultura adicionada de antibiótico e um em cultura sem antibiótico) e quatro (2%) foram positivos apenas para amostras renais (três em cultura com antibiótico e um sem antibiótico). Apenas um dos sete animais com cultura positiva apresentou ao cultivo em meio de Fletcher® positividade nos fragmentos de fígado e rim simultaneamente.

A distribuição dos sete animais positivos de acordo com o órgão examinado e propriedade avaliada pode ser apreciada na **tabela 3**.

TABELA 3 - Distribuição de sete ovinos positivos à cultura em meio de Fletcher®, segundo o órgão examinado e propriedade de origem. Botucatu/SP, 2010.

PROPRIEDADE	Nº DE ANIMAIS ESTUDADOS/ Nº DE ANIMAIS POSITIVOS	CULTURA	
		FÍGADO	RIM
A	5/2	1	1
G	5/2	2	0
H	5/1 ^a	1	1
J	5/1	0	1
R	5/1	0	1
TOTAL		4	4

^a Animal com cultura positiva para fígado e rim

Em todos os ovinos com cultivo positivo a partir de fragmentos de fígado e/ou rim, foram visualizados à microscopia de campo escuro espiroquetídeos com movimento espiralado característico, em culturas contendo ou não antibióticos.

Dois animais da propriedade A, apresentaram cultivo positivo em meio de cultura contendo antibiótico, tanto nos cultivos de fígado quanto de rim. Já na propriedade G, dois animais, apresentaram cultivo positivo em meio de cultura contendo antibiótico, nos cultivos hepáticos. Na propriedade H, um animal apresentou cultivo positivo em meio de cultura sem antibiótico, tanto de fragmento de fígado quanto de rim.

Já nas propriedades J e R, um ovino de cada localidade apresentou cultivo positivo a partir de fragmento de rim, em meio de cultura contendo antibiótico.

Todas as leituras dos cultivos em meio de cultura de Fletcher® foram realizadas após um mês de incubação, em estufa bacteriológica a 29°C e posteriormente incubadas em temperatura ambiente em caixas de isopor e em microscopia de campo escuro, durante quatro meses, sendo as leituras realizadas quinzenalmente. Não foram observadas nos tubos de cultivo, tanto com ou sem antibióticos, a presença da formação de anel de opalescência (zona de Dinger). Os cultivos positivos foram visualizados microscopicamente apenas pela presença de espiroquetídeos com movimento em espiral característico.

5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

Dentre os 100 ovinos avaliados, 12 (12%) apresentaram positividade à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., sendo que dentre as 20 propriedades estudadas, em oito (40%) apresentaram animais positivos por esta técnica em pelo menos um animal. Dos 200 fragmentos de fígado e rim submetidos à PCR, 186 (93%) foram negativas e 14 (7%) foram positivas. Destas sete (3,5%) foram positivas apenas para as amostras de fragmentos hepáticos e sete (3,5%) foram positivas apenas para amostras de fragmentos renais. Dos 12 animais positivos, dois apresentaram positividade à PCR para em fragmentos de fígado e rim simultaneamente.

A distribuição dos 12 animais positivos de acordo com o órgão examinado e procedência pode ser apreciada na **tabela 4**.

TABELA 4 - Distribuição de 12 ovinos positivos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. segundo o órgão examinado e procedência. Botucatu/SP, 2010.

PROPRIEDADE	Nº DE ANIMAIS ESTUDADOS/ Nº DE ANIMAIS POSITIVOS	PCR	
		FÍGADO	RIM
A	5/2 ^a	2	1
G	5/2	2	0
H	5/2 ^a	2	1
J	5/1	0	1
M	5/1	0	1
Q	5/1	0	1
R	5/2	0	2
U	5/1	1	0
TOTAL		7	7

^a Animal com PCR positivo para fígado e rim

Nas propriedades A e H, dois animais foram positivos à prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., com um apresentando positividade em ambos os órgãos testados e o outro positividade em amostra hepática.

Dois animais, da propriedade G, foram positivos à PCR, ambos em fragmento hepático. Já nas propriedades J, M e Q, um animal de cada localidade, apresentaram fragmentos renais positivos à PCR.

Dois animais da propriedade R, foram positivos à PCR, nas amostras renais. Já na propriedade U, um animal foi positivo ao exame de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., em fragmento hepático.

A figura 3 ilustra os resultados de amplificação de 331pb de *Leptospira* spp., pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores LEP 1 e LEP2.

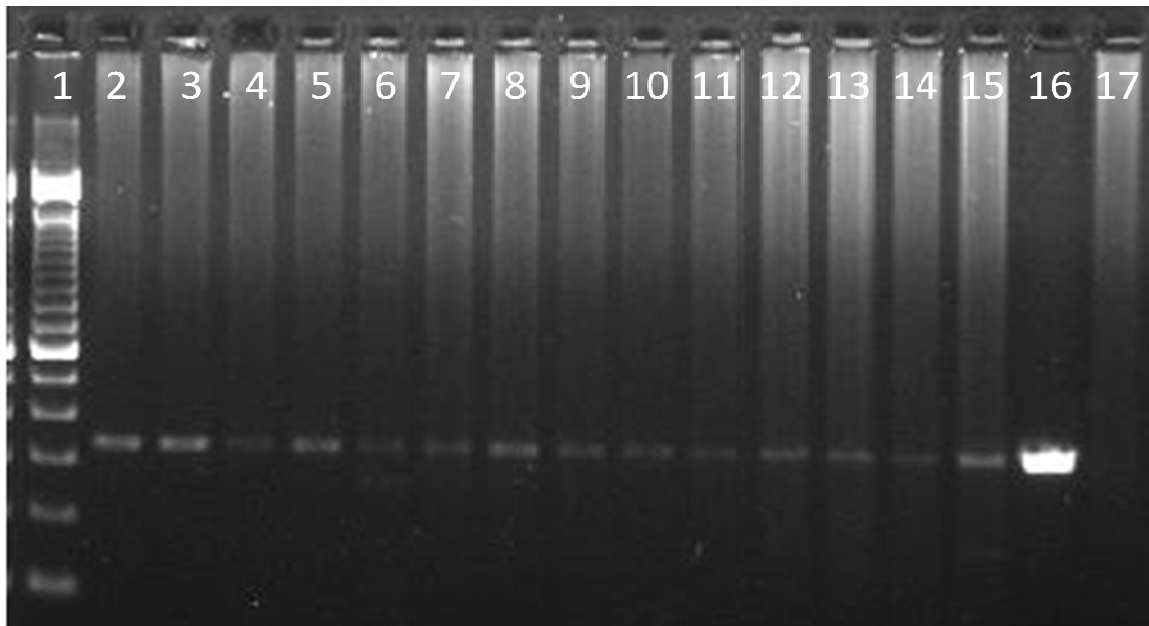


FIGURA 3 – Produtos de amplificação a partir dos fragmentos de fígado e rim de 12 ovinos, pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. de oito diferentes propriedades localizados no Estado de São Paulo. Legenda: 1- 331 pares de base (pb) (Invitrogen); 2- A1F; 3- A2F; 4- A2R; 5-G1F; 6-G2F; 7- H1F; 8-H1R; 9- H2F; 10-J1R; 11- M1R; 12- Q1R; 13- R1R; 14- R2R; 15- U1F; 16 – Controle Positivo; 17- Controle Negativo.

5.4. Relação entre as técnicas utilizadas

Do total de 20 propriedades analisadas, observou-se que, em 13 (65%) haviam animais reagentes a pelo menos uma das provas diagnósticas utilizadas. Do total de cinco animais analisados por propriedade o número máximo de ovinos reagentes foi de três.

À prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), 23 animais (23%) foram reagentes, sete animais (7%) foram positivos à técnica de cultivo em meio de Fletcher® e 12 ovinos (12%) apresentaram fragmentos de rim e/ou fígado positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. (**Tabela 5**).

TABELA 5 – Resultados obtidos das técnicas diagnósticas, em relação à procedência e animais estudados. Botucatu/SP, 2010.

PROPRIEDADE	ANIMAIS ANALISADOS / ANIMAIS REAGENTES	PROVAS POSITIVAS		
		SAM	CULTURA	PCR
A	5/2	1	2	2
B	5/0	-	-	-
C	5/1	1	-	-
D	5/2	2	-	-
E	5/2	2	-	-
F	5/1	1	-	-
G	5/2	2	2	2
H	5/2	2	1	2
I	5/0	-	-	-
J	5/1	1	1	1
L	5/3	3	-	-
M	5/3	3	-	1
N	5/0	-	-	-
O	5/0	-	-	-
P	5/0	-	-	-
Q	5/1	1	-	1
R	5/2	1	1	2
S	5/0	-	-	-
T	5/0	-	-	-
U	5/3	3	-	1
TOTAL		23	7	12

Legenda: SAM – Soroaglutinação Microscópica; PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase para *Leptospira* spp.

Do total de 100 ovinos, 75 (75%) foram negativos em todas as provas realizadas; 13 animais (13%) foram positivos somente à sorologia; quatro animais (4%) foram positivos à sorologia e ao cultivo e/ou PCR de rim; quatro animais (4%) positivos à sorologia e ao cultivo e/ou PCR de fígado; dois animais (2%) positivos à sorologia e ao cultivo e/ou PCR de rim e fígado simultaneamente; um animal (1%) negativo à sorologia e positivo ao cultivo e/ou PCR de rim e um animal (1%) negativo à sorologia e positivo ao cultivo e/ou PCR de fígado (**Tabela 6**).

TABELA 6 - Cruzamento entre todas as variáveis diagnósticas utilizadas: cultivo de fígado, cultivo de rim, sorologia, PCR de fígado e PCR de rim. Botucatu/SP 2010.

CULTIVO FÍGADO*	CULTIVO RIM*	SOROLOGIA*	PCR FÍGADO*	PCR RIM*	Nº DE ANIMAIS
-	-	-	-	-	75
-	-	+	-	-	13
-	-	+	-	+	3
-	+	+	-	+	1
-	+	-	-	+	1
-	+	+	+	+	1
+	+	+	+	+	1
+	-	-	+	-	1
-	-	+	+	-	2
+	-	+	+	-	2
TOTAL					100

Legenda: (+) positivos; (-) negativos;

*Cultivos em meio de Fletcher® com e sem antibiótico;

*Sorologia pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM);

* Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

Dentre os cruzamentos das técnicas utilizadas e sua proporção de concordância os resultados obtidos nas técnicas de cultura e PCR em ambos os tecidos (fígado e rim) apresentaram uma proporção de concordância de 0,97, considerada boa ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$). Em relação à sorologia frente às

duas técnicas de detecção do agente (cultura e PCR) de ambos os tecidos a concordância foi considerada fraca com proporção 0,79; 0,82; 0,81 e 0,85 ($p < 0,01$) (**Tabela 7**). Todos os resultados foram estatisticamente significativos.

TABELA 7 - Proporção de concordância das respostas segundo o cruzamento de interesse. Botucatu/SP, 2010.

CRUZAMENTO	PROPORÇÃO CONCORDÂNCIA	VALOR DE p
Cultura de fígado X PCR fígado	0,97	$p < 0,0001$
Cultura de rim X PCR rim	0,97	$p < 0,001$
Cultura de fígado X Sorologia	0,79	$p < 0,01$
Cultura de rim X Sorologia	0,79	$p < 0,01$
PCR fígado X Sorologia	0,82	$p < 0,001$
PCR rim X Sorologia	0,82	$p < 0,0001$
Cultura X Sorologia	0,81	$p < 0,01$
PCR X Sorologia	0,85	$p < 0,001$

Nas **tabelas 8 e 9**, do total de 100 fragmentos de fígado e de 100 fragmentos de rim avaliados, quatro foram positivos simultaneamente à cultura e à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. e, em três fragmentos foram positivos somente à técnica de PCR.

TABELA 8 - Resultados de cultura de *Leptospira* spp. a partir de fragmentos hepáticos de 100 ovinos procedentes de 20 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, segundo a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. Botucatu/SP, 2010.

PCR FÍGADO	CULTURA FÍGADO		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	4	3	7
NEGATIVO	0	93	93
TOTAL	4	96	100

TABELA 9 - Resultados de cultura de *Leptospira* spp. a partir de fragmentos renais de 100 ovinos procedentes de 20 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, segundo à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. Botucatu/SP, 2010.

PCR RIM	CULTURA RIM		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	4	3	7
NEGATIVO	0	93	93
TOTAL	4	96	100

Dentre os resultados obtidos no cruzamento da sorologia frente ao cultivos e a PCR, observa-se que sensibilidade da técnica molecular foi superior à técnica de cultivo (**Tabelas 10 e 11**).

TABELA 10 – Resultados dos 100 ovinos procedentes de 20 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, sorologicamente positivos e negativos, frente ao cultivo de fragmentos de fígado e rim. Botucatu/SP, 2010.

CULTIVO	SOROLOGIA		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	5	2	7
NEGATIVO	18	75	93
TOTAL	23	77	100

Sensibilidade 22%; Especificidade 97%

TABELA 11 – Resultados dos 100 ovinos procedentes de 20 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, sorologicamente positivos e negativos, frente à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. em fragmentos de fígado e rim . Botucatu/SP, 2010.

PCR	SOROLOGIA		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	10	2	12
NEGATIVO	13	75	88
TOTAL	23	77	100

Sensibilidade 43%; Especificidade 97%

Os resultados gerais de todas as técnicas diagnósticas utilizadas neste estudo podem ser visualizados no **apêndice 1**.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Sorologia – Soroaglutinação microscópica (SAM)

Devido à dificuldade em se obter a prevalência da leptospirose no Estado de São Paulo nos rebanhos ovinos, este trabalho procurou verificar a presença da doença em diferentes propriedades, tomando como ponto estratégico a colheita de amostras biológicas em frigorífico. Apesar deste aspecto, permite-se que se tenha uma noção geral de sua ocorrência e pode-se sugerir quais sorovares de *Leptospira* spp. possuem maior importância na região de origem dos animais.

De acordo com os resultados sorológicos obtidos, observou-se que, em 65% das propriedades haviam animais reagentes a leptospirose, indicando que esta zoonose está presente na maioria dos rebanhos ovinos do Estado de São Paulo. Este fato demonstra a importância da doença nesses animais, tanto no impacto econômico negativo para os rebanhos, devido a queda de índices de fertilidade, aborto e nascimento de cordeiros fracos, bem como em relação aos aspectos de saúde pública, no tocante a seu aspecto ocupacional, pela interação direta do produtor e em alguns casos por integrantes da sua própria família, com estes animais durante a lida diária, bem como pelas atividades dos magarefes dos frigoríficos, durante o abate dos animais e contato direto com sangue e vísceras.

A diferença de resultados sorológicos positivos e negativos observadas entre as propriedades pode ser consequência da sua variação geográfica, bem como devido as diferentes técnicas de manejo higiênico-sanitárias adotadas em cada propriedade.

A sorologia positiva encontrada neste estudo pode estar relacionada desde o contato prévio com o agente etiológico sem o desenvolvimento da doença, até a presença de animais doentes e portadores.

Em relação ao total de 100 animais estudados, 23 animais (23%) apresentaram soropositividade, concordando com estudo realizados por Viegas et al. (1980) na Bahia, que encontraram 22,8% de ovinos reagentes e Salaberry (2010), em Uberlândia/MG, revelando 22,2% dos animais como sororreagentes. Entretanto foram relatadas pesquisas com percentuais superiores aos encontrados neste estudo, como os trabalhos de Santa Rosa e Castro (1963) em São Paulo com 34%, Caldas et al. (1986) na Bahia com

34,7% e Herrmann et al. (2004), no Rio Grande do Sul com 34,26%; e em trabalho realizado na Espanha por Leon-Vizcaino et al. (1987) com 64,7% de soropositividade.

Percentuais inferiores ao encontrado neste estudo, foram relatados por Favero et al. (2000) em São Paulo, com 0,7%; Azevedo et al. (2004a) no Rio Grande do Norte com 3,5%; Silva et al. (2007) no Rio Grande do Sul com 20,5%; Cardoso et al. (2008) na região sudoeste de São Paulo com 15%; Melo (2010) no Distrito Federal, com 3%; em trabalho descrito por Zamora et al. (1999), no Chile, com 5,7% e Vidic et al. (2007), na Sérvia, com 3,2% de animais sororreagentes.

Estas variações podem ocorrer devido às diferentes condições de manejo, variações climáticas, precipitações pluviométricas de cada região e população de roedores favorecendo ou não a disseminação da leptospirose.

Neste estudo, o sorovar mais frequente à técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi Autumnalis. Este resultado se assemelha a investigações feitas por Viegas et al. (1980) e Caldas et al. (1986) na Bahia, relatando que o sorovar mais frequente foi o Autumnalis, e em trabalho de Escócio et al. (2008), que estudaram a soroprevalência de *leptospira* em ovinos de Sorocaba/SP, região também abrangida neste estudo.

Outros trabalhos corroboram aos obtidos na presente pesquisa, como nos relatados por Hathaway et al. (1982), na Inglaterra e por Ahl et al. (1992), nos Estados Unidos, que apresentaram o sorovar Autumnalis em seus resultados.

Entretanto, resultados obtidos da pesquisa realizada por Langoni et al. (1995) em 356 soros de ovinos procedentes do estado de São Paulo, apontaram os sorovares mais frequentes para Icterohaemorrhagiae (51,25%) e Castellonis (20,63%); Favero et al. (2002) em São Paulo, destacaram o sorovar mais frequente como sendo o Icterohaemorrhagiae. Segundo Herrmann et al. (2004), em ovinos do Rio Grande do Sul, o sorovar mais importante foi o Hardjo; Azevedo et al. (2004a) no Rio Grande do Norte, relataram os sorovares Castellonis e Autumnalis; Lilenbaum et al. (2007) com a maior importância do sorovar Hardjo e Shermani em pesquisa realizada no Rio de Janeiro; Cardoso et al. (2008), em São Paulo com os sorovares Icterohaemorrhagiae e Pyrogenes; Melo (2010) em trabalho no Distrito Federal com Hardjoprajitno

como mais frequente e Salaberry (2010) em Uberlândia/MG, com os sorovares Hardjo e Autumnalis.

Na Espanha, Leon-Vizcaino et al. (1987) relataram como os sorovares mais freqüentes Pomona e Sejroe; no Chile, Zamora et al. (1999) destacaram os sorovares Icterohaemorrhagiae e Autumnalis; Ciceroni et al. (2000) na Itália apresentaram o sorovar Castellonis e Sejroe e Dorjee et al. (2008) na Nova Zelândia, relataram o sorovar Hardjobovis.

O sorovar Autumnalis é comumente isolado de animais silvestres, especialmente de roedores (SILVA et al., 2008), o que poderia indicá-los como participantes da cadeia epidemiológica de transmissão da leptospirose nos rebanhos ovinos estudados. O tipo de criação extensiva e intensiva poderia explicar este fato, pois a presença de roedores silvestres pode ter favorecido a ocorrência da leptospirose nas propriedades, já que os roedores são considerados a principal fonte de infecção de *Leptospira* spp., o que justifica-se a necessidade de adoção de medidas de controle de ratos, pois estes liberam leptospiros pela urina contaminando o ambiente e infectando os ovinos, bem como outras espécies animais e também o próprio homem.

Outros sorovares reagentes encontrados neste estudo foram Djasiman, Hardjoprajitno, Wolffi e Patoc. O sorovar Wolffi e Hardjoprajitno estão relacionados à infecção em bovinos (SALABERRY, 2010); já o sorovar Djasiman é encontrado comumente em animais silvestres e o Patoc é tido como sorovar saprófita. Alguns estudos demonstraram certa evidência de que os ovinos sejam hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo, servindo como reservatório para bovinos (LEONARD et al., 2004). Entretanto, neste trabalho, apenas um animal demonstrou positividade para este sorovar.

A maioria dos animais reagentes apresentaram títulos de anticorpos antileptospira baixos, provavelmente em consequência de contato prévio antigo. Apenas um animal apresentou título 1600 para o sorovar Autumnalis com co-aglutinação para outros sorovares, como Butembo, Grippothyphosa, Icterohaemorrhagiae e Patoc, apresentando reação sorológica característica de infecção aguda.

Segundo Azevedo et al. (2004a) a identificação deste sorovar em ovinos causa preocupação, que vai desde a contaminação do ambiente até a proteção específica, visto que não há imunidade cruzada, pois no mercado existem

vacinas compostas basicamente, pelos sorovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona.

6.2. Cultura em meio de Fletcher®

A taxa de isolamento obtida neste trabalho foi de 4% (8/200), sendo superior aos valores obtido por Azevedo et al. (2004b), encontrando 2,5% (4/160) de positividade em amostras de renais cultivadas de ovinos. Segundo Thiermann (1984), a baixa taxa de isolamento de *Leptospira* spp. pode ser dependente de vários fatores, tais como o tipo de meio de cultivo utilizado, o sorovar envolvido, o tempo de processamento da amostra, o método de colheita do material (séptica ou assepticamente), a contaminação e a seleção do antibióticos utilizados. O não isolamento do agente em 18 ovinos sorologicamente positivos pode ser explicado por tratar-se de animais que tiveram contato com a leptospira, sem evolução da infecção ou doença ou ainda pelos fatores citados por Thiermann (1984). Por outro lado, dois animais sorologicamente negativos apresentaram isolamento positivo, um para rim e outro para fígado. Este fato expõe duas possíveis situações: em relação ao fígado, o animal estaria em fase inicial de infecção sem apresentar títulos de anticorpos detectáveis pela SAM; e quanto ao rim, o animal poderia estar infectado por um sorovar diferente ao testado na técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), sem ter ocorrido reação cruzada.

Embora a técnica de cultivo em meio de Fletcher® seja laboriosa, de custo elevado e que demande tempo prolongado de execução, muitas vezes resultando em pouco sucesso no isolamento do agente, para estudos epidemiológicos a identificação do sorovar é de grande importância, pois o agente isolado pode ser posteriormente estudado para sua caracterização quanto aos perfis moleculares e genéticos.

Como fôra discutido anteriormente, a presença de leptospiros viáveis em fígado e rins de ovinos, aparentemente saudáveis, encaminhados para o abate reforça a possibilidade da transmissão da doença para magarefes, quando da manipulação destes materiais, bem como para os trabalhadores rurais que lidam diretamente com estes animais, caracterizando esta enfermidade como uma zoonose de grande importância. Além disso, os animais portadores renais

podem transmitir o agente para trabalhadores rurais, pelo contato direto com a urina ou ambiente contaminado.

6.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

A taxa de detecção à prova de PCR foi de 7% do total de amostras analisadas (14/200), superior ao encontrado pela técnica de cultivo, que foi de 4% (8/200). A não detecção do agente em 13 animais com sorologia positiva e negativos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., pode ser explicada pelo mesmo motivo ocorrido no cultivo, ou seja por tratar-se de animais que tiveram contato com a leptospira sem evolução da infecção ou doença ou ainda por fatores citados por Thiermann (1984).

Por outro lado dois animais sorologicamente negativos apresentaram PCR positivo, um para rim e outro para fígado. Este fato expõe duas possíveis situações: em relação ao fígado, o animal estaria em fase inicial de infecção sem apresentar títulos de anticorpos detectáveis pela SAM; e quanto ao rim, o animal poderia estar infectado por um sorovar diferente ao testado na técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), sem ter ocorrido reação cruzada.

A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi mais prática e rápida na detecção da *Leptospira* spp. se comparada à técnica do cultivo em meio de Fletcher®. Entretanto, é uma técnica gênero-específica e, até o momento, não foi desenvolvida uma técnica de biologia molecular que permita a identificação da espécie e sorogrupo/sorovar de *Leptospira* spp. diretamente em amostras biológicas, o que torna fundamental o isolamento do agente.

6.4. Resultados entre as técnicas utilizadas

A Soroaglutinação Microscópica (SAM) é o teste de referência mundial para o diagnóstico da leptospirose, com alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, verifica-se algumas dificuldades quanto a sua interpretação, já que existe uma limitação para estabelecer se os animais sorologicamente positivos estejam realmente infectados. Além disso, a reação cruzada verificada entre os diferentes sorovares pode dificultar o revelando do sorovar infectante.

A presença de anticorpos antileptospiras, muitas vezes, não reflete a real situação da infecção ou doença nos animais, estabelecendo somente a resposta imunológica do hospedeiro, que pode ser por contato prévio sem o

desenvolvimento da infecção ou doença. Este fato pode ser verificado nesta pesquisa, em relação ao número de animais sorologicamente positivos e animais negativos na detecção de leptospira pelo cultivo e/ou Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), o que foi constatado pela fraca concordância da sorologia com a presença do agente nos tecidos estudados.

Estatisticamente, houve boa concordância dos resultados das técnicas de cultivo frente PCR de ambos os tecidos analisados. Porém, quando os resultados são analisados (tabelas 8 e 9) somente observando-se as amostras positivas, verifica-se que, do total das sete amostras positivas em fragmento de fígado e rim à técnica de PCR, três foram negativas ao cultivo, em ambos os tecidos, o que corresponde a 42,8% de negatividade, ou seja, a cultura detecta 42,8 vezes menos que a técnica de PCR.

O resultado da sensibilidade das duas técnicas de detecção do agente, tomando como base os animais positivos na sorologia, demonstrou maior sensibilidade da PCR frente ao cultivo. Este resultado tem sido comprovado em diversos estudos de comparação das técnicas (LILENBAUM et al., 2009).

Analisando-se conjuntamente os resultados obtidos nas três técnicas de diagnóstico realizadas, observaram-se os prováveis estágios de infecção nos ovinos estudados, baseando-se em estudo de Levett (2001) (**Anexo 4**): Dos 100 ovinos analisados, 75 animais foram negativos em todas as provas realizadas, indicando ausência de infecção; 13 animais foram positivos somente à sorologia, indicando provavelmente um contato anterior com o agente etiológico sem desenvolvimento da doença, ou ainda em fase posterior à convalescença, não mais portador renal, mas ainda com anticorpos detectáveis (memória imunológica).

Quatro animais apresentaram sorologia positiva, com técnica de cultivo e/ou PCR de rim positivos, provavelmente indicando que estes animais encontravam-se em fase crônica da infecção e colonização renal (portador renal) com anticorpos detectáveis; quatro animais apresentaram sorologia positiva, com a técnica de cultivo e/ou PCR de fígado positivo, provavelmente indicando que estes animais encontravam-se em fase aguda da infecção, em leptospiremia e com anticorpos detectáveis, mas ainda sem colonização renal.

Dois animais apresentaram sorologia positiva, com técnica de cultivo e/ou PCR de rim e fígado positivos, provavelmente indicando que estes

animais encontravam-se em estágio final da fase aguda, ainda com leptospiremia, anticorpos detectáveis e colonização renal.

Apenas um animal apresentou sorologia negativa e cultivo e PCR de rim positivo, provavelmente indicando que este animal esteja infectado por um sorovar não presente na bateria de antígenos estudados à técnica Soroaglutinação Microscópica (SAM) utilizada neste trabalho, não apresentando reação cruzada para os sorovares testados, encontrando-se na fase de convalescência e portador renal.

Obtivemos ainda apenas um animal com sorologia negativa e cultivo e PCR de fígado positivos, provavelmente indicando que este animal encontrava-se em infecção recente, com leptospiremia, ainda sem anticorpos detectáveis e sem colonização renal.

Em relação ao provável estágio de infecção encontrado nos 23 animais sorologicamente positivos, nove ovinos (39,1%), com cultura e/ou PCR positivos em amostras hepáticas, apresentavam-se em fase aguda da infecção, o que poderia indicar que a infecção era constante nestas propriedades. Em relação aos 23 animais sorologicamente positivos, nove ovinos (39,1%) com cultura e/ou PCR positivos em amostras renais, apresentavam-se em fase crônica da infecção (portador renal), o que poderia indicar que estes animais pudessem atuar como reservatórios da doença, disseminando o agente ao meio ambiente, a outros animais e ao homem.

Portanto, neste trabalho pôde-se verificar que, frente às pesquisas avaliados o sorovar *Autumnalis* foi o mais importante nestes ovinos estudados, tendo-se 23% de animais sorologicamente positivos.

Embora hajam poucos estudos relacionados a isolamento de leptospiras em ovinos, o resultado apresentado, quando comparado a outros trabalhos, foi maior, e a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. conseguiu detectar os animais verdadeiramente infectados, demonstrando em que provável fase da infecção estes animais se encontravam, caracterizando a leptospirose como uma doença importante na espécie ovina, de caráter ocupacional.

Como medida de prevenção à leptospirose é necessário que se adotem medidas de manejo higiênico-sanitárias mais eficazes, a fim de evitar que a

doença se instale nos rebanhos de ovinos, bem como ocorra a transmissão do agente para o meio ambiente e para os hospedeiros susceptíveis.

Para isto, mediante o diagnóstico positivo para leptospirose no rebanho, tendo em vista a proteção vacinal sorovar-específica, é importante utilizar vacinas para o rebanho contendo o maior número possível de sorovares presentes no rebanho ou na região específica de criação, ainda que a imunidade seja curta e sejam necessário doses de reforço (PUGH, 2004). Há também a necessidade de aplicação de antibioticoterapia na tentativa de eliminação dos portadores renais, visando à redução ou eliminação dos fatores de risco.

Evitar o contato de animais sadios com outras espécies possíveis portadoras de leptospirosas; prevenir e/ou eliminar a população de roedores existente; evitar o acesso a água de superfície onde coabitam animais silvestres e, para a espécie ovina especialmente, promover o manejo separado de outras espécies de animais, como os bovinos, evitando a pastagem consorciada, são medidas passíveis de execução visando a não instalação da leptospirose no rebanho de ovinos. Desta forma, evitam-se prejuízos econômicos aos produtores, bem como previne-se a disseminação de leptospirosas para o meio ambiente e para o homem. Portanto, é papel do médico veterinário na prevenção desta zoonose nos rebanhos, contribuindo, direta e indiretamente, para um estado sanitário de ótima qualidade e, conseqüentemente, na proteção da população humana susceptível.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- ✓ Vinte e três por cento (23%) de ovinos procedentes de vinte diferentes propriedades localizadas no Estado São Paulo apresentaram títulos de anticorpos para leptospirosas, tendo-se destacado o sorovar Autumnalis.
- ✓ O isolamento de *Leptospira* spp., bem como a sua detecção pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), comprovou o estado de portador renal e/ou fase aguda da infecção em nove ovinos, confirmando a importância destes animais como possíveis fontes de contaminação para o meio ambiente e fontes de infecção para trabalhadores rurais e magarefes, caracterizando a leptospirose como doença ocupacional;
- ✓ A prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. foi a mais rápida, prática e sensível para detecção deste microrganismo em tecidos renais e hepáticos, quando comparado ao cultivo em meio de Fletcher®;
- ✓ Houve uma fraca concordância da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) frente às provas de detecção do agente pelas técnicas de cultivo em meio de Fletcher® e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

Referências

8. Referências

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n 3-4, p.287-296, 2010.

AHL, A. S.; MILLER, D. A.; BARTLETT, P. C. Leptospira serology in small ruminants on St. Croix, U.S. Virgin Islands. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 16, p. 168-71, 1992.

AVELAR, K.E.S.; PEREIRA, M.M. Espiroquetídeos. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p.399-408.

AZEVEDO, S.S. ALVES, C.J., ANDRADE, J.S.L. BATISTA, C.S.A., CLEMENTINO, I.J., SANTOS, F.A.,. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v.11, n.3, p.167-170, 2004a. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V71_3/azevedo>. Acesso em: 10 nov. 2009.

AZEVEDO, S.S., ALVES, C.J., ANDRADE, J.S.L., SANTOS, J.A., FREITAS, T.D., BATISTA, C.S.A.. Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. **Arquivo Instituto Biológico**. 71, 383–385, jul/set, 2004b.

BADKE, M.R.T. Leptospirose 2001. Disponível em <http://www.cnpqa.embrapa.br/abravessc/pdfMemorias2001/1_manuelrenato.pdf>. Acesso em 03 set. 2009.

BALAKRISHNAN, G., GOVINDARAJAN R., PARIMAL ROY, P. GOPU, JAYAKUMAR, V., AND MURALI MANOHAR, B. Diagnosis of leptospiral mastitis in a cow by polymerase chain reaction. **Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences**, v. 5, p.75-76, 2009.

BHARADWAJ, R. Leptospirosis – a reemerging disease?. **Indian Journal Medicine Research**. v.120, p.136-138, 2004.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1999. 98p.

CALDAS, E. M.; SAMPAIO, M. B.; VIEGAS, E. A.; VIEGAS, S. A. R. A.; DIAS, E. M. M. Aglutininas antileptospira em ovinos e caprinos na região Nordeste do Estado da Bahia. **Arquivo Escola Medicina Veterinária Universidade Federal Bahia**, v. 8, n. 1, p. 88-98, 1986.

CARDOSO, M.V., LARA, M.C.C.S.H., CHIEBAO, D., GABRIEL, F.H.L., VILLALOBOS, E.M.C., PAULIN, L.M., CASTRO, V., NASSAR, A.; CUNHA, E.M.S., PIATTI, R.M., PITUCO, E.M. Determinação da condição sanitária de rebanhos caprinos e ovinos na região sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado, RS. **Anais...**Gramado: CONBRAVET, 2008. Disponível em: <<http://www.soreges.com.br/combravet2008/anais/cd/resumos/R06II-2.pdf>>. Acesso em 12 de maio de 2009.

CARVALHO, R.B. **Potencialidades dos mercados para produtos derivados de caprinos e ovinos**. Disponível em <<http://www.capritec.com.br/pdf/CAPRITEC.doc>>. Acesso em 18 dez. 2006.

CEBRA, C.; CEBRA, M. Enfermidades dos sistemas hematológico, imunológico e linfático (doenças multissistêmicas) In:___ PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo. Rocca, cap. 14, p. 420, 2004.

CICERONI, L., LOMBARDO, D., PINTO, A., CIARROCCHI, S., SIMEONI, J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol. **Journal Veterinary Medicine B**, 47, 217– 223, 2000.

COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PULSSELY, P.R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. **Applied Microbiology**, 25 (6), 976-980, 1973.

CORRÊA, WM.; CORRÊA, C.N.M. Leptospiroses. In: _____. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. cap.21, p.219-231.

COUSINS, D.V., ELLIS, T.M., PARKINSON, J., MCGLASHAN, C.H. Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Veterinary Record**. 124, 123–124, 1989.

DORJEE, S., HEUER, C., JACKSON, R., WEST, DM., COLLINS-EMERSON, JM., MIDWINTER, AC., RIDLER, AL. Prevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep in a sheep-only abattoir in New Zealand, **New Zealand Veterinary Journal** 56(4), 164-170, 2008.

ELLIS, W.A., BRYSON, D.G., NEILL, S.D., MCPARLAND, P.J., MALONE, F.E., Positive involvement of leptospire in abortion, stilbirths and neonatal deaths in sheep. **Veterinary Record**, v.26, n.12, p.291-293, 1983.

ELLIS, W.A. Leptospirosis in pig. **Pig Veterinary Journal**, Cambridge, v.28, p.24-34, 1992.

ELLIS, G. R.; PARTINGTON, D. L.; HINDMARSH, M.; BARTON, M. D. Seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo in merino stud rams in South Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 7, p. 203-206, 1994.

ESCÓCIO, C.F., GENOVEZ, M.E., CASTRO, V., PAULIN, L.M.S., PIATTI, R.M., OKUDA, L.H., GABRIEL, F.H.L., CHIEBAO, D.P., FELICIO, P.S., ALMEIDA, M.C.S. Perfil sanitário de rebanhos ovinos criados exclusivamente

ou consorciados com bovinos na região de Sorocaba-São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado, RS. **Anais...** Gramado: CONBRAVET, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0693-2.pdf>>. Acesso em 18 maio 2009.

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

FAINE, S. *Guidelines for the control of leptospires*. 2 ed. Geneva, World Health Organization, 1982, 171p. (Who offset publications, n. 67).

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

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA. Manual de Controle de Roedores, 2002.

GALTON, M. M.; SULZER, C. R.; SANTA ROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of a Microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 81-85, 1965.

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

GOMES, M. Gênero *Leptospira* spp. Disciplina de Microbiologia Clínica Veterinária FAVET-UFRGS – 4º Semestre 2009-2. Disponível em <<http://www.ufgrs.br/labacvet/pdf/Lepto.pdf>>. Acesso em 03 set. 2009.

GORDON, L.M. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Hardjoprajitmo from sheep. **Australian Veterinary Journal**, v.56, n.7, p. 348-349, 1980.

HATHAWAY, S.C. Leptospirosis in New Zealand: an ecological view. **New Zealand Veterinary Journal**, v.29, n.7, p.109-112, 1981.

HATHAWAY, S.C., LITTLE, T.W., STEVENS, A.E. Serological survey of leptospiral antibodies in sheep from England and Wales. **Veterinary Record**, 110, 99–101, 1982.

HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M.; GREGORI, F.; HIGA, Z.M.M.; VASCONCELLOS, S.A.; RICHTZEBHAUN, 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, p. 261-267, 2000.

HERRMANN, G.P., LAGE, A.P., MOREIRA, E.C., HADDAD, J.P.A., RESENDE, J.R., RODRIGUES, R.O., LEITE, R.L. Soroprevalência da aglutininas anti-leptospira spp. em ovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 443-448, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário - 2007**. Disponível em: <http://www.sepof.pa.gov.br/seplan/Para_em_numero/PDFs/DESENVOLVIMENTO_ECONOMICO/Pecuaria/Efetivo_do_Principais_Rebanhos_BR.pdf>. Acesso em 27 maio de 2010.

LANGONI, H.; MARINHO, M.; BALDINI, S.; DA SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DA SILVA, E. D. Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em soros ovinos do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutinação em placa e soroaglutinação microscópica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 264-268, 1995.

LARSSON, C.E., YASUDA, P.H., SANTA ROSA, C.A. Leptospirose suína. Inquérito sorológico e bacteriológico em municípios dos Estados de São Paulo, do Paraná e de Santa Catarina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.21, n.1, p.43-50, 1984.

LEONARD, N.; MEE, J.F.; SNIJDERS, S.; MACKIE, D. Prevalence of antibodies of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in bulk tank milk from unvaccinated Irish dairy herds. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 57, n. 4, p. 226-231, 2004.

LEON-VIZCAINO; L. MENDONZA, M.H.; GARRIDO, F. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.10, p.149-153, 1987.

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

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F.Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S.A. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 69, p. 837-842, 2008.

LILENBAUM, W., VARGES, R. A., RISTOW, R., CORTEZ, A., SOUZA, S.O., RICHTZENHAIN, L.J., VASCONCELLOS, S.A. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p.16–19, 2009.

MAGAJEVSKI, F. S. ***Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em fetos e oócitos colhidos de vacas no momento do abate.** Jaboticabal, SP. 2007. 83 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

MAGAJEVSKI, F.S., GÍRIO, R.J.S. Avaliação da sensibilidade da PCR frente a quatro técnicas para extração de DNA de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em sêmen bovino experimentalmente contaminado. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal,SP ,v.24, n.1, 029-033, 2008.

MARTINS, E.C. **Ovinocultura no Brasil**: novas fronteiras. 2007. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=862>>. Acesso em 19 dez. 2006.

MELO, L.S.S, CASTRO, M.B, LEITE, R.C., MOREIRA, E.C., MELO, C.B. Principais aspectos da infecção por *Leptospira* spp. em ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, Maio, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010005000072&lng=en&nrm=iso> Acesso em 25 mai 2010.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SANINT-GIRONS, T. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 2219-2224, 1992.

NORMAN, G. R., STREINER, D. L. **Biostatistics**: The bare essentials. Mosby Year Book, St. Louis, 260p. 1994.

OIE 2006. Leptospirosis, Chapter 2.2.4. World Organisation for Animal Health. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm>. Acesso em 06 julh. 2009.

OLIVEIRA, S.J. Atualização nos conceitos sobre leptospirose em suínos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.14, n. 52-55, 1994.

OVINOS: carne impulsiona Ovinocultura no Sudeste. **Revista Rural**, v.101, jul. 2006. Disponível em:

<http://www.revistarural.com.br/Edicoes/edicao_2006.htm>. Acesso em 16 jan. 2007.

PASSOS, E.C., VASCONCELLOS, S.A., ITO, F.H., YASUDA, P.H., NÜRMBERGER, JUNIOR R. Isolamento de leptospiros a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* serotipo Pomona. Emprego das técnicas da pipeta Pasteur e das diluições seriadas em meios de cultura de Fletcher tratado com 5-fluor-uracil ou o sulfato de neomicina. **Revista Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia/USP**, 25, 221-235. 1988.

PUGH, D.G. In: **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo. Rocca, cap. 6, p. 203 -204, 2004.

QUINN, P.J.; CARTIER, M.E.; MARKEY, B. In: **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994, 648p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas pelas *Leptospiras* spp. In: **Clínica Veterinária**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007, p. 874-887.

SAGLAM, Y.S. Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 74, p.119–122, 2008.

SALABERRY, S.R.S. **Epidemiologia das principais doenças infecciosas de ovinos do município de Uberlândia, MG**. Uberlândia, 2010, 72f. Dissertação (Ciências Veterinária – Saúde Animal), Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia.

SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P. Aglutininas anti-leptospira em soros ovinos e caprinos no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.30, n.16, p.93-98, 1963.

SHIMABUKURO, F.H. **Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiras pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose.** Botucatu, SP. 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

SHIMABUKURO, F.H. **Avaliação sorológica e detecção molecular de leptospiras em tecidos de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola.** Botucatu, SP. 2007. 100f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

SILVA, E.F., BROD, C.S., CERQUEIRA, G.M., BOURSCHEIDT, D., SEYFFERT, N., QUEIROZ, A., SANTOS, C.S., KO, A.I., DELLAGOSTIN, O.A. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Veterinary Microbiology.**, n.121, p.144-149, 2007.

SILVA, R.C., ZETUN,C.B, BOSCO,S.M.G, BAGAGLI,E., ROSA,P.S, LANGONI,H. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging armadillos. **Veterinary Parasitology**,157, 291–293, 2008.

SIMPLÍCIO, A.A.; SIMPLÍCIO, K.M.M.G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: Desafios e oportunidades. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n.12, p. 7-18, 2006.

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

VASCONCELLOS, S. A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. **Comunicado Científico Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade São Paulo**, São Paulo, v.3, n.3-4, p.189-195, 1979.

VIDIC, B., SAVIC-JEVĐENIC, S., GRGIC, Z., BUGARSKI, D., MALJKOVIC, M. Infectious abortion in sheep. **Biotechnology in Animal Husbandry**, n.23, p.383-389, 2007.

VIEGAS, E.A.; VIEGAS, S.A.R.A.; CALDAS, E.M. Aglutininas anti-leptospira em hemo-soro de caprinos e ovinos no estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, Salvador, v. 5, n.1, p. 20-34, 1980.

ZAMORA, J., RIEDEMANN, S., TADICH, N. A serological survey of leptospirosis in sheep in Chile. **Revista Latinoamericana Microbiology**, 41, 73–76, 1999.

ZAVITSANOU, A.; BABATSIKOU, F. Leptospirosis: epidemiology and preventive measures. **Health Science Journal**, v.2, 2008.

ZUNINO, E.M.; ROLANDO, P.P. Leptospirosis. Puesta al día. Leptospirosis. A literature review. **Revista Chilena de Infectologia**, v.24 n.3, 2007.

Anexos

ANEXO 1 - Atestado de aprovação do projeto de pesquisa pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP.



ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa “**Pesquisa de leptospiros pelo isolamento e reação de cadeia pela polimerase (PCR) para *Leptospira spp.* Em amostras renais e hepáticas de ovinos sorologicamente positivos e negativos para leptospirose, abatidos em matadouro, procedentes de Bauru (SP) e Região**”, Protocolo nº 95/2008-CEEA, de **Priscila Barbante**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Mestrado desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 8 de abril de 2008.


PROF. ASS. DR. LUIZ HENRIQUE ARAÚJO MACHADO
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000
☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

ANEXO 2 - Declaração de liberação para processamento de amostras biológicas no Laboratório regional de Sorocaba/SP do Instituto Adolfo Lutz.




**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
LABORATÓRIO REGIONAL DE SOROCABA**



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que a aluna de mestrado Priscila Barbante, Pós-graduanda da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu, mediante solicitação cordial, está processando as amostras biológicas do seu projeto de pesquisa, intitulado **“Pesquisa de leptospiros pelo isolamento e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. em amostras renais e hepáticas de ovinos sorologicamente positivos e negativos para leptospirose, abatidos em matadouro, procedentes de Bauru (SP) e região”**, nos Laboratórios desta Instituição, especificamente, para isolamento do microrganismo em meio de cultura e separação de soro das amostras sanguíneas.

Sorocaba, 25 de junho de 2009

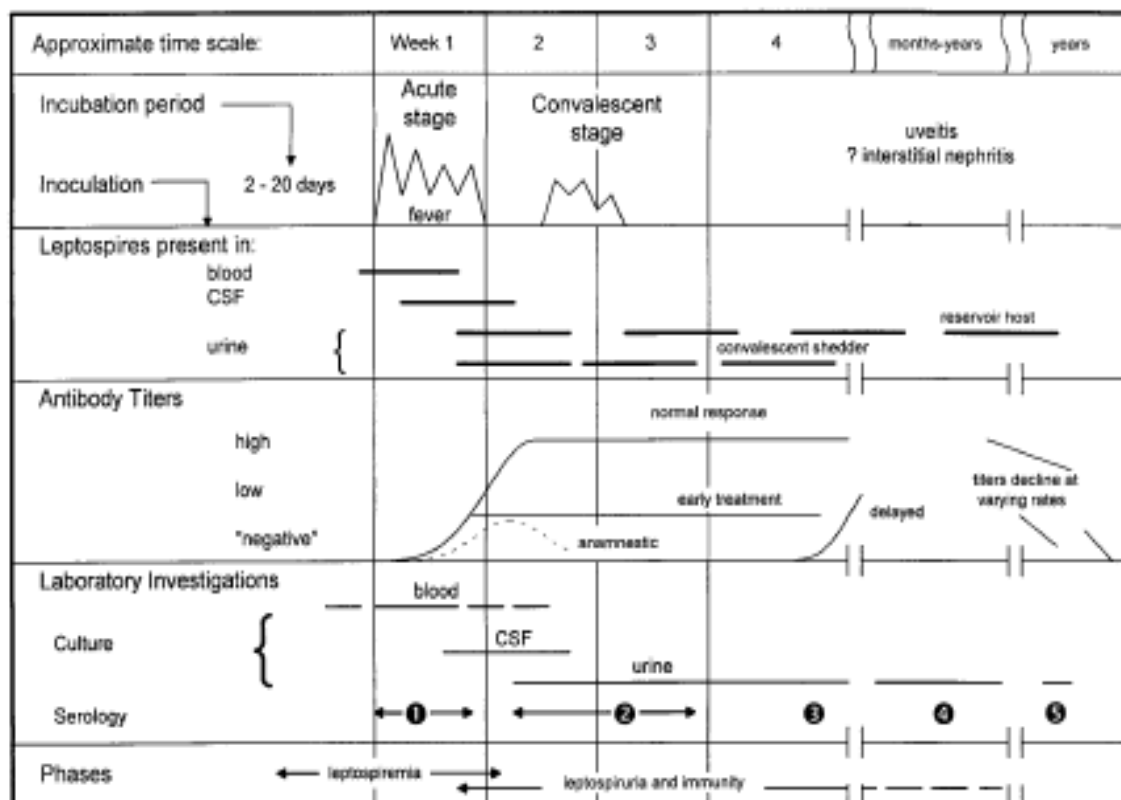

Fabio Hiroto Shimabukuro
Pesquisador Científico
Laboratório de Hepatites Virais e Leptospirose


Dra. Ângela Maria Girardi Dias
Diretora Técnica de Serviços de Saúde
IAL – Laboratório Regional de Sorocaba

ANEXO 3 - Protocolo de extração e purificação de DNA de *Leptospira* spp. dos fragmentos de fígado e rim de ovinos analisados utilizando kit comercial Illustra™ tissue & cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®), segundo o manual do fabricante.

1. Adicionou-se 50µL solução de lise 1;
2. Adicionou-se 10µL proteinase K (20mg/mL);
3. Misturou-se em vórtex 15 segundos;
4. Incubou-se a 56°C por 1 hora;
5. Centrifugou-se por 10 segundos a 2.000g;
6. Adicionou-se 5µL RNase;
7. Adicionou-se 500µL de lise 2;
8. Misturou-se em vórtex 15 segundos;
9. Incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos;
10. Transferiu-se a mistura para o filtro do kit Illustra no tubo de 2mL;
11. Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
12. Descartou-se o líquido centrifugado;
13. Adicionou-se 500µL de lise 2;
14. Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
15. Descartou-se o líquido centrifugado;
16. Adicionou-se 500µL de tampão de lavagem;
17. Centrifugou-se a 11.000g por 3 minutos;
18. Descartou-se o tubo coletor de 2mL;
19. Transferiu-se o filtro para um microtubo de 1,5mL livre de DNase e RNase;
20. Adicionou-se 200µL do tampão de eluição a 70°C;
21. Incubou-se a temperatura ambiente 1 minuto;
22. Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
23. Descartou-se o filtro;
24. Armazenou-se os microtubos em geladeira *over night*.

ANEXO 4 – Tabela dos estágios da infecção por *Leptospira* spp., segundo Levett (2001).



Fonte: Leptospirosis: phases and relevant diagnostic procedures (Diagram prepared by Dr. L.H. Turner.) Reproduced from the transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene by permission of the editor pag 621, vol.3 Bacterial Diseases – Topley & Wilson`s, 1990.

Apéndice

Trabalho Científico

TRABALHO CIENTÍFICO A SER ENVIADO PARA A REVISTA

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Isolamento e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. em amostras renais e hepáticas de ovinos sorologicamente positivos e negativos para leptospirose, abatidos em frigorífico, procedentes do Estado de São Paulo

Priscila BARBANTE¹, Fabio Hiroto SHIMABUKURO³, Virginia Bodelão Richini PEREIRA¹, Hélio LANGONI¹, Simone Baldini LUCHEIS^{1,2}

¹ Departamento de Higiene e Saúde Pública Veterinária, UNESP – Botucatu/SP.

² Agência Paulista dos Tecnologia dos Agronegócios, APTA/SAA, Unidade de Pesquisa de Bauru/SP.

³ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Sorocaba/SP.

*Corresponding author

Endereço: Av. Rodrigues Alves, 40-40 – Horto Florestal – Bauru-SP

CEP 17030-000 - Tel.+55 14 3203-3257

e-mail address: silucheis@apta.sp.gov.br (S. B. Lucheis)

RESUMO

Nos últimos anos a ovinocultura reapareceu na região Sudeste, principalmente no estado de São Paulo, como solução econômica para os pecuaristas. Entretanto, havendo um estado sanitário deficiente na criação, pode-se haver a instalação de doenças nos rebanhos e diminuição na produção, como ocorre na leptospirose, uma das zoonoses mais representativas. Com o intuito de estudar a presença de *Leptospira* spp. nos rebanhos ovinos, foram colhidas 100 amostras sanguíneas e os respectivos fragmentos de fígado e rim dos animais de 20 diferentes propriedades, durante o abate em um frigorífico da região de Sorocaba-SP. Pela prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) obteve-se 23 amostras sorológicas positivas (23%) para um ou mais sorovares de *Leptospira* spp., com prevalência do sorovar Autumnalis. Para a pesquisa do agente em fragmentos de fígado e rim, 100 amostras de cada tecido foram cultivadas em meio de Fletcher, obtendo-se oito (4%) amostras positivas, sendo quatro para rim e quatro para fígado. Destes, cinco animais apresentaram sorologia positiva (um animal positivo simultaneamente para fígado e rim) e dois negativos. Com a prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. houve positividade em 14 (7%) amostras, sendo sete de rim e sete de fígado. Destes, dez eram animais positivos sorologicamente (dois animais positivos simultaneamente para fígado e rim) e dois negativos. Em relação a técnica de cultivo em meio de Fletcher®, a prova PCR demonstrou-se mais rápida, prática e sensível na detecção de leptospirose. Pelos resultados obtidos ressalta-se a importância da espécie ovina no contexto epidemiológico da leptospirose.

Palavras chave: Cultivo, Leptospirose, Ovinos, PCR, SAM

INTRODUÇÃO

Uma das enfermidades mais representativas no tocante às doenças de caráter zoonótico, com grande importância econômica nos animais de produção é a leptospirose, doença infecto-contagiosa que ocasiona queda na produção de leite, abortamentos e baixa fertilidade. Além disso, constitui sério problema para saúde pública e está relacionada às características sócio-econômicas, às enchentes e também aos aspectos ocupacionais em humanos (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Azevedo et al. (2004b) alertaram para a transmissão da doença em trabalhadores de abatedouros pela manipulação de órgãos e carcaças de animais infectados.

Nos animais de produção, têm sido evidenciadas leptospirosas tanto na urina como no sêmen e em secreções vaginais, caracterizando nestas espécies como susceptíveis a doença relacionada à esfera reprodutiva (LILENBAUM et al., 2008).

A ocorrência de *Leptospira* spp. nos ovinos parece ser comum na maioria dos países do mundo, particularmente em rebanhos que utilizam sistemas de manejo extensivo, em que a criação das ovelhas ocorre juntamente com bovinos, possibilitando a infecção pelo contato direto com a urina ou pela água contaminada nos bebedouros coletivos (ELLIS et al., 1983; ELLIS, 1994).

A infecção de ovinos foi detectada no Brasil, pela primeira vez, por Santa Rosa e Castro (1963), em animais procedentes do estado de São Paulo, nos quais foram encontrados 34% de animais reagentes para vários sorovares de *Leptospira* spp.

Estudos sorológicos foram realizados posteriormente, por Viegas et al. (1980), na Bahia encontrando-se 22,8% de ovinos reagentes, principalmente para os sorovares Autumnalis, Castellonis, Grippytyphosa e Tarassovi. Em outro trabalho realizado na Bahia, Caldas et al. (1986), observaram 34,7% de ovinos reagentes de uma amostragem de 800 animais examinados, sendo os sorovares mais frequentes Autumnalis, Castellonis e Butembo. Já Langoni et al. (1995), pesquisaram aglutininas antileptospirosas em 356 soros de ovinos de diferentes regiões do Estado de São Paulo, tendo-se encontrado: Icterohaemorrhagiae (51,25%); Castellonis (20,63%), Hardjo (19,36%); Bratislava (16,25%); Andamana e Wolffi (11,88%); Copenhageni (8,75%); Grippytyphosa (4,34%); Pomona (2,5%) e Tarassovi (0,63%).

Pesquisa feita por Favero et al. (2002), em São Paulo, verificaram 0,7% de positividade em soros de ovinos, destacando-se os sorovares Icterohaemorrhagiae, Butembo, Castellonis e Hebdomadis como reagentes.

No Estado do Rio Grande do Sul, foi verificado que, pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), das 1360 amostras de soros testadas, 466 (34,26%) animais foram reagentes e os títulos de aglutininas antileptospiras variavam de 100 a 3200. Os sorovares encontrados foram Hardjo (28,4%), Sentot (16,8%); Hardjoprajitno (14,5%), mostrando que a *Leptospira* spp. está disseminada na maioria das fazendas que criam ovinos nas mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Rio Grande do Sul (HERRMANN et al., 2004).

Azevedo et al. (2004a), no Rio Grande do Norte, verificaram que 3,5% dos animais eram soropositivos, sendo que os sorovares mais prováveis foram Castellonis (57,1%), Autumnalis (28,6%) e Pomona (14,3%). Em anos seguintes Silva et al. (2007), analisaram ovinos abatidos em Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul, observando-se 20,5% de soropositividade para o sorogrupos Autumnalis, Bataviae, Sejroe e Icterohaemorrhagiae em 44 ovinos pesquisados. Lilenbaum et al. (2009) em pesquisa no Rio de Janeiro relataram que os sorovares de maior importância encontrados foram Hardjo e Shermani.

Em estudo realizado por Escócio et al. (2008), foi analisado o perfil sanitário de rebanhos de ovinos criados exclusivamente ou consorciados com bovinos na região de Sorocaba/SP. Foi verificado que, dentre as enfermidades analisadas, a leptospirose demonstrou grande importância, tendo em vista que todos os rebanhos foram reagentes para pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp., sendo que, em apenas quatro rebanhos de criação exclusiva de ovinos a prevalência foi do sorovar Autumnalis, seguido por Pyrogenes e em sete rebanhos com criação consorciada (ovino/bovino) a prevalência foi do sorovar Icterohaemorrhagiae, Hardjo e Javanica.

Cardoso et al. (2008) determinaram a condição sanitária dos rebanhos de caprinos e ovinos na região sudoeste do Estado de São Paulo, tendo-se verificado que, dos 100 ovinos analisados para leptospirose pela técnica de SAM, 15% foram reagentes, sendo os sorovares mais prevalentes Icterohaemorrhagiae (26,6%), seguido de Pyrogenes, Wolffi e Hardjo (13,3%) e pelo sorovar Bratislava, Castellonis, Canicola e Hardjo (6,6%).

Em estudo realizado no Distrito Federal, por Melo (2010), verificou-se que, de 157 ovinos analisados 3% eram soropositivos, tendo como sorovar reagente o Hardjoprajitno.

Análises realizadas em soros de 334 ovinos de Uberlândia/MG revelaram soroprevalência de 22,2%, tendo-se os sorovares mais frequentes o Hardjo (23,6%),

Autumnalis (22,4%), a associação dos sorovares Hardjo e Wolffi (17,9%) e Grippytyphosa (14,4%) (SALABERRY, 2010).

A infecção do rebanho ovino por leptospiras leva a sérios prejuízos econômicos, representados por distúrbios fisiológicos e alterações reprodutivas. Nesse contexto, pretende-se verificar a ocorrência de anticorpos antileptospiras em ovinos abatidos em frigoríficos, procedentes de diferentes municípios do Estado de São Paulo, e pesquisar a presença de ovinos sorologicamente positivos e negativos como portadores renais (fase crônica) de *Leptospira* spp. e detecção do agente no fígado (fase aguda), pelo cultivo em meio de Fletcher através da técnica de pipeta Pasteur e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e Localidades

Foram utilizados 100 ovinos de 20 propriedades, de diferentes municípios do Estado de São Paulo. As amostras biológicas foram colhidas no momento do abate, escolhendo-se cinco animais de cada propriedade.

2.2. Amostras

Na fase de sangria, foram colhidos aproximadamente 10 mL de sangue com de cada animal, em um tubo de vidro estéril de 15 mL. Após a retração do coágulo as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos e o soro obtido foi acondicionado em microtubo de 1,5 mL, congelado a -20°C para posteriormente ser realizada a prova sorológica.

Foram colhidos assepticamente um fragmento do fígado e um dos rins (direito ou esquerdo) na fase de evisceração. Estes foram acondicionados individualmente em sacos plásticos devidamente vedados e identificados, sob temperatura de refrigeração em caixa isotérmica e transferida até o laboratório

2.3. Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foram realizadas segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995). Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:100 em solução salina tamponada pH 7,2 como ponto de corte positivo e testada para 29 sorovares de *Leptospira* spp, considerando-se como positiva aquela que apresentou 50% ou mais de aglutinação em relação ao controle. As amostras positivas ao título inicial foram novamente diluídas sucessivamente na razão dois

testadas para os sorovares que reagiram anteriormente. O título final foi aquele que ainda apresentou 50% ou mais de aglutinação (FAINE, 1989).

2.4. Cultura em meio de Fletcher®

Os fragmentos de fígado e rim utilizados para o cultivo foram processados segundo Passos et al. (1988). O material obtido foi cultivado em três tubos de meio de cultura Fletcher®, sendo que, dois em meio de Fletcher® acrescido de 100µg de 5-fluorouracil/mL e de 2,5 µg de neomicina e um em meio Fletcher® sem antibiótico, incubados a 28°C a 30°C por 16 semanas. As leituras foram realizadas quinzenalmente após a semeadura, considerando-se amostras positivas quando a visualização de espiroquetas móveis em microscopia de campo escuro, no aumento de 400X.

2.5. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

Os fragmentos de fígado e rim foram pré-triturado com o auxílio de pinça e bisturi estéril e acondicionados em microtubos estéril de 1,5 mL livre de DNase e RNase. Adicionou-se às amostras 1mL de PBS 7,2 estéril e centrifugou-se a 19.000 g por 30 minutos a 4°C, em ambos os fragmentos, segundo Heinemann et al. (2000) com algumas adaptações para lavagem do tecido, foi descartado o sobrenadante e ao botão celular foi adicionado 50µL de PBS 7,2 estéril e procedeu-se a maceração com o bio-vortexer (Biospec Inc.) e foi centrifugado a 2000 g por 10 segundos.

Adicionou-se às amostras 1mL de PBS 7,2 estéril e centrifugou-se a 19.000 g por 30 minutos a 4°C, em ambos os fragmentos, segundo Heinemann et al. (2000) com algumas adaptações para lavagem do tecido. Descartou-se o sobrenadante e ao botão celular adicionado-se 50µL de PBS 7,2 estéril. Em seguida, procedeu-se a maceração com o bio-vortexer (Biospec Inc.) e centrifugou-se a 2.000 g por 10 segundos.

A partir das amostras de fígado e rins, procedeu-se à extração de DNA utilizando-se o kit **Illustra™ Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®)**, conforme recomendações do fabricante.

Os iniciadores foram descritos por Mérien et al. (1992) os quais amplificam 331pb, como segue: LEP 1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3')
LEP 2 (5' TTCCCCCATGAGCAAGATT 3').

A amplificação do DNA foi realizada segundo a adaptação descrito por Mérien et al. (1992). As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL com

volumes totais de 25,0µL, sendo 2,5µL de solução tampão de PCR (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0), 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µL de solução de dNTP (0,2mM), 0,5µL de *Taq Platinum* DNA (1U) (Invitrogen®), 0,5µL de cada iniciador (10pM), 17,75µL de água ultrapura e 2µL de DNA da amostra obtida no final da extração a 10ng.

A preparação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), com o seguinte perfil de ciclagem: 94°C por três minutos, 30 ciclos de 94°C por um minuto, anelamento a 63°C por 1 minuto e extensão a 72°C por dois minutos, incluindo-se dez minutos adicionais a 72°C ao final para completar a extensão dos segmentos amplificados.

A visualização dos produtos amplificados foi realizada pela técnica de eletroforese. Para tanto preparou-se gel de agarose a 1,5% adicionado de 1µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®). Foram utilizados 15µL do produto de PCR e como marcador de peso molecular 4µL de 100pb ladder (Invitrogen®). Para todas as amostras foram adicionados 2µL de uma solução de Blue Juice Gel Loading (Invitrogen®). O gel foi submetido a corrida eletroforética em cuba horizontal HE99 (GE-Healthcare) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09m de ácido bórico e 0,001M de EDTA) e a voltagem de 100V por aproximadamente uma hora utilizando a fonte Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE-Healthcare). O gel foi visualizado no transluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema GelDoc-It™ Imaging System foi documentada utilizando-se software Vision Works®LS.

Para cada seqüência de extração e purificação, e técnica Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) das amostras, foram utilizados controles. Foram preparados suspensões de fígado e rim, contaminados com *L. interrogans* sorovar Pyrogenes, na concentração de $2,0 \times 10^4$ leptospira/mL, como controle positivo. Para o controle negativo foi utilizado água ultrapura.

Para a sensibilidade analítica foram testadas diferentes amostras de tecido (fígado e rim) sabidamente negativas, através da contaminação das amostras com *L. interrogans* sorovar Pyrogenes, nas concentrações de aproximadamente $2,0 \times 10^0$; $2,0 \times 10^1$; $2,0 \times 10^2$; $2,0 \times 10^3$ e $2,0 \times 10^4$ microrganismos por mililitros de suspensão de cada amostra de órgão (SHIMABUKURO, 2007).

4.0 RESULTADOS

Dentre as 20 propriedades pesquisadas, 13 (65%) apresentaram pelo menos um animal com sorologia positiva. Do total de 100 amostras de soro analisadas pela prova Soroaglutinação Microscópica (SAM), 23 (23%) foram reagentes para um ou mais de um sorovar de *Leptospira* spp.

Dos 29 sorovares de *Leptospira* spp. testados, apenas nove (31%) foram reagentes. Dezenove animais (82,6%) foram reagentes para o sorovar Autumnalis, com títulos variando de 100 a 1600. Outros sorovares reagentes foram Butembo (n=2), Castellonis (n=1), Djasiman (n=1), Grippothyphosa (n=1), Icterohaemorrhagiae (n=1), Wolffii (n=1), Patoc (n=3) e Hardjoprajitno (n=1), com títulos variando de 100 a 200. O título maior obtido foi de 1600 para o sorovar Autumnalis, em um único animal (Tabela 1).

Dentre os 100 ovinos avaliados, sete (7%) apresentaram cultivo positivo e, dentre as 20 propriedades pesquisadas, cinco (25%) apresentaram ovinos com cultura positiva para leptospirose em pelo menos um animal. Dos 200 fragmentos de fígado e rim submetidos ao cultivo em meio de Fletcher® com ou sem antibiótico, 192 (96%) foram negativos e oito (4%) foram positivos. Destes, quatro (2%) foram positivos apenas em relação aos fragmentos hepáticos (três em cultura adicionada de antibiótico e um em cultura sem antibiótico) e quatro (2%) foram positivos apenas para amostras renais (três em cultura com antibiótico e um sem antibiótico). Apenas um dos sete animais com cultura positiva apresentou ao cultivo em meio de Fletcher® positividade nos fragmentos de fígado e rim simultaneamente.

Todas as leituras dos cultivos em meio de cultura de Fletcher® foram realizadas após um mês de incubação, em estufa bacteriológica a 29°C e posteriormente incubadas em temperatura ambiente em caixas de isopor e em microscopia de campo escuro, durante quatro meses, sendo as leituras realizadas quinzenalmente. Não foram observadas nos tubos de cultivo, tanto com ou sem antibióticos, a presença da formação de anel de opalescência (zona de Dinger). Os cultivos positivos foram visualizados microscopicamente apenas pela presença de espiroquetídeos com movimento em espiral característico.

Dentre os 100 ovinos avaliados, 12 (12%) apresentaram positividade à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., sendo que dentre as 20 propriedades estudadas, em oito (40%) apresentaram animais positivos por esta técnica em pelo menos um animal. Dos 200 fragmentos de fígado e rim submetidos à PCR, 186 (93%) foram negativas e 14 (7%) foram positivas. Destas sete (3,5%) foram

positivas apenas para as amostras de fragmentos hepáticos e sete (3,5%) foram positivas apenas para amostras de fragmentos renais. Dos 12 animais positivos, dois apresentaram positividade à PCR para em fragmentos de fígado e rim simultaneamente. A figura 1 ilustra os resultados de amplificação de 331pb de *Leptospira* spp., pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores LEP 1 e LEP2.

4.1. Resultados da relação entre as técnicas utilizadas

Do total de 20 propriedades analisadas, observou-se que, em 13 (65%) haviam animais reagentes a pelo menos uma das provas diagnósticas utilizadas. Do total de cinco animais analisados por propriedade o número máximo de ovinos reagentes foi de três.

À prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), 23 animais (23%) foram reagentes, sete animais (7%) foram positivos à técnica de cultivo em meio de Fletcher® e 12 ovinos (12%) apresentaram fragmentos de rim e/ou fígado positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

Do total de 100 ovinos, 75 (75%) foram negativos em todas as provas realizadas; 13 animais (13%) foram positivos somente à sorologia; quatro animais (4%) foram positivos à sorologia e ao cultivo e/ou PCR de rim; quatro animais (4%) positivos à sorologia e ao cultivo e/ou PCR de fígado; dois animais (2%) positivos à sorologia e ao cultivo e/ou PCR de rim e fígado simultaneamente; um animal (1%) negativo à sorologia e positivo ao cultivo e/ou PCR de rim e um animal (1%) negativo à sorologia e positivo ao cultivo e/ou PCR de fígado.

Dentre os cruzamentos das técnicas utilizadas e sua proporção de concordância os resultados obtidos nas técnicas de cultura e PCR em ambos os tecidos (fígado e rim) apresentaram uma proporção de concordância de 0,97, considerada boa ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$). Em relação à sorologia frente às duas técnicas de detecção do agente (cultura e PCR) de ambos os tecidos a concordância foi considerada fraca com proporção 0,79; 0,82; 0,81 e 0,85 ($p < 0,01$). Todos os resultados foram estatisticamente significativos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Sorologia – Soroaglutinação microscópica (SAM)

Devido à dificuldade em se obter a prevalência da leptospirose no Estado de São Paulo nos rebanhos ovinos, este trabalho procurou verificar a presença da doença em diferentes propriedades, tomando como ponto estratégico a colheita de amostras

biológicas em frigorífico. Apesar deste aspecto, permite-se que se tenha uma noção geral de sua ocorrência e pode-se sugerir quais sorovares de *Leptospira* spp. possuem maior importância na região de origem dos animais.

De acordo com os resultados sorológicos obtidos, observou-se que, em 65% das propriedades haviam animais reagentes a leptospirose, indicando que esta zoonose está presente na maioria dos rebanhos ovinos do Estado de São Paulo. Este fato demonstra a importância da doença nesses animais, tanto no impacto econômico negativo para os rebanhos, devido a queda de índices de fertilidade, aborto e nascimento de cordeiros fracos, bem como em relação aos aspectos de saúde pública, no tocante a seu aspecto ocupacional, pela interação direta do produtor e em alguns casos por integrantes da sua própria família, com estes animais durante a lida diária, bem como pelas atividades dos magarefes dos frigoríficos, durante o abate dos animais e contato direto com sangue e vísceras.

A diferença de resultados sorológicos positivos e negativos observadas entre as propriedades pode ser consequência da sua variação geográfica, bem como devido a diferentes técnicas de manejo higiênico-sanitárias adotadas em cada propriedade.

A sorologia positiva encontrada neste estudo pode estar relacionada desde o contato prévio com o agente etiológico sem o desenvolvimento da doença, até a presença de animais doentes e portadores.

Em relação ao total de 100 animais estudados, 23 animais (23%) apresentaram soropositividade, concordando com estudo realizados por Viegas et al. (1980) na Bahia, que encontraram 22,8% de ovinos reagentes e Salaberry (2010), em Uberlândia/MG, revelando 22,2% dos animais como sororreagentes. Entretanto foram relatadas pesquisas com percentuais superiores aos encontrados neste estudo, como os trabalhos de Santa Rosa e Castro (1963) em São Paulo com 34%, Caldas et al. (1986) na Bahia com 34,7% e Herrmann et al. (2004), no Rio Grande do Sul com 34,26%; e em trabalho realizado na Espanha por Leon-Vizcaino et al. (1987) com 64,7% de soropositividade.

Percentuais inferiores ao encontrado neste estudo, foram relatados por Favero et al. (2000) em São Paulo, com 0,7%; Azevedo et al. (2004a) no Rio Grande do Norte com 3,5%; Silva et al. (2007) no Rio Grande do Sul com 20,5%; Cardoso et al. (2008) na região sudoeste de São Paulo com 15%; Melo (2010) no Distrito Federal, com 3%; em trabalho descrito por Zamora et al. (1999), no Chile, com 5,7% e Vidic et al. (2007), na Sérvia, com 3,2% de animais sororreagentes.

Estas variações podem ocorrer devido às diferentes condições de manejo, variações climáticas, precipitações pluviométricas de cada região e população de roedores favorecendo ou não a disseminação da leptospirose.

Neste estudo, o sorovar mais frequente à técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi Autumnalis. Este resultado se assemelha a investigações feitas por Viegas et al. (1980) e Caldas et al. (1986) na Bahia, relatando que o sorovar mais freqüente foi o Autumnalis, e em trabalho de Escócio et al. (2008), que estudaram a soroprevalência de *leptospira* em ovinos de Sorocaba/SP, região também abrangida neste estudo.

Outros trabalhos corroboram aos obtidos na presente pesquisa, como nos relatados por Hathaway et al. (1982), na Inglaterra e por Ahl et al. (1992), nos Estados Unidos, que apresentaram o sorovar Autumnalis em seus resultados.

Entretanto, resultados obtidos da pesquisa realizada por Langoni et al. (1995) em 356 soros de ovinos procedentes do estado de São Paulo, apontaram os sorovares mais frequentes para Icterohaemorrhagiae (51,25%) e Castellonis (20,63%); Favero et al. (2002) em São Paulo, destacaram o sorovar mais frequente como sendo o Icterohaemorrhagiae. Segundo Herrmann et al. (2004), em ovinos do Rio Grande do Sul, o sorovar mais importante foi o Hardjo; Azevedo et al. (2004a) no Rio Grande do Norte, relataram os sorovares Castellonis e Autumnalis; Lilenbaum et al. (2007) com a maior importância do sorovar Hardjo e Shermani em pesquisa realizada no Rio de Janeiro; Cardoso et al. (2008), em São Paulo com os sorovares Icterohaemorrhagiae e Pyrogenes; Melo (2010) em trabalho no Distrito Federal com Hardjoprajtino como mais frequente e Salaberry (2010) em Uberlândia/MG, com os sorovares Hardjo e Autumnalis.

Na Espanha, Leon-Vizcaino et al. (1987) relataram como os sorovares mais freqüentes Pomona e Sejroe; no Chile, Zamora et al. (1999) destacaram os sorovares Icterohaemorrhagiae e Autumnalis; Ciceroni et al. (2000) na Itália apresentaram o sorovar Castellonis e Sejroe e Dorjee et al. (2008) na Nova Zelândia, relataram o sorovar Hardjobovis.

O sorovar Autumnalis é comumente isolado de animais silvestres, especialmente de roedores (SILVA et al., 2008), o que poderia indicá-los como participantes da cadeia epidemiológica de transmissão da leptospirose nos rebanhos ovinos estudados. O tipo de criação extensiva e intensiva poderia explicar este fato, pois a presença de roedores silvestres pode ter favorecido a ocorrência da leptospirose nas propriedades, já que os

roedores são considerados a principal fonte de infecção de *Leptospira* spp., o que justifica-se a necessidade de adoção de medidas de controle de ratos, pois estes liberam leptospiras pela urina contaminando o ambiente e infectando os ovinos, bem como outras espécies animais e também o próprio homem.

Outros sorovares reagentes encontrados neste estudo foram Djasiman, Hardjoprajitno, Wolffii e Patoc. O sorovar Wolffii e Hardjoprajitno estão relacionados à infecção em bovinos (SALABERRY, 2010); já o sorovar Djasiman é encontrado comumente em animais silvestres e o Patoc é tido como sorovar saprófita. Alguns estudos demonstraram certa evidência de que os ovinos sejam hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo, servindo como reservatório para bovinos (LEONARD et al., 2004). Entretanto, neste trabalho, apenas um animal demonstrou positividade para este sorovar.

A maioria dos animais reagentes apresentaram títulos de anticorpos antileptospira baixos, provavelmente em consequência de contato prévio antigo. Apenas um animal apresentou título 1600 para o sorovar Autumnalis com co-aglutinação para outros sorovares, como Butembo, Grippothyphosa, Icterohaemorrhagiae e Patoc, apresentando reação sorológica característica de infecção aguda.

Segundo Azevedo et al. (2004a) a identificação deste sorovar em ovinos causa preocupação, que vai desde a contaminação do ambiente até a proteção específica, visto que não há imunidade cruzada, pois no mercado existem vacinas compostas basicamente, pelos sorovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona.

5.2. Cultura em meio de Fletcher®

A taxa de isolamento obtida neste trabalho foi de 4% (8/200), sendo superior aos valores obtido por Azevedo et al. (2004b), encontrando 2,5% (4/160) de positividade em amostras de renais cultivadas de ovinos. Segundo Thiermann (1984), a baixa taxa de isolamento de *Leptospira* spp. pode ser dependente de vários fatores, tais como o tipo de meio de cultivo utilizado, o sorovar envolvido, o tempo de processamento da amostra, o método de colheita do material (séptica ou assepticamente), a contaminação e a seleção do antibióticos utilizados. O não isolamento do agente em 18 ovinos sorologicamente positivos pode ser explicado por tratar-se de animais que tiveram contato com a leptospira, sem evolução da infecção ou doença ou ainda pelos fatores citados por Thiermann (1984). Por outro lado, dois

animais sorologicamente negativos apresentaram isolamento positivo, um para rim e outro para fígado. Este fato expõe duas possíveis situações: em relação ao fígado, o animal estaria em fase inicial de infecção sem apresentar títulos de anticorpos detectáveis pela SAM; e quanto ao rim, o animal poderia estar infectado por um sorovar diferente ao testado na técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), sem ter ocorrido reação cruzada.

Embora a técnica de cultivo em meio de Fletcher® seja laboriosa, de custo elevado e que demande tempo prolongado de execução, muitas vezes resultando em pouco sucesso no isolamento do agente, para estudos epidemiológicos a identificação do sorovar é de grande importância, pois o agente isolado pode ser posteriormente estudado para sua caracterização quanto aos perfis moleculares e genéticos.

Como fôra discutido anteriormente, a presença de leptospiras viáveis em fígado e rins de ovinos, aparentemente saudáveis, encaminhados para o abate reforça a possibilidade da transmissão da doença para magarefes, quando da manipulação destes materiais, bem como para os trabalhadores rurais que lidam diretamente com estes animais, caracterizando esta enfermidade como uma zoonose de grande importância. Além disso, os animais portadores renais podem transmitir o agente para trabalhadores rurais, pelo contato direto com a urina ou ambiente contaminado.

5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

A taxa de detecção à prova de PCR foi de 7% do total de amostras analisadas (14/200), superior ao encontrado pela técnica de cultivo, que foi de 4% (8/200). A não detecção do agente em 13 animais com sorologia positiva e negativos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., pode ser explicada pelo mesmo motivo ocorrido no cultivo, ou seja por tratar-se de animais que tiveram contato com a leptospira sem evolução da infecção ou doença ou ainda por fatores citados por Thiermann (1984).

Por outro lado dois animais sorologicamente negativos apresentaram PCR positivo, um para rim e outro para fígado. Este fato expõe duas possíveis situações: em relação ao fígado, o animal estaria em fase inicial de infecção sem apresentar títulos de anticorpos detectáveis pela SAM; e quanto ao rim, o animal poderia estar infectado por um sorovar diferente ao testado na técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), sem ter ocorrido reação cruzada.

A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi mais prática e rápida na detecção da *Leptospira* spp. se comparada à técnica do cultivo em meio de Fletcher®. Entretanto, é uma técnica gênero-específica e, até o momento, não foi desenvolvida uma técnica de biologia molecular que permita a identificação da espécie e sorogrupo/sorovar de *Leptospira* spp. diretamente em amostras biológicas, o que torna fundamental o isolamento do agente.

5.4. Resultados entre as técnicas utilizadas

A Soroaglutinação Microscópica (SAM) é o teste de referência mundial para o diagnóstico da leptospirose, com alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, verifica-se algumas dificuldades quanto a sua interpretação, já que existe uma limitação para estabelecer se os animais sorologicamente positivos estejam realmente infectados. Além disso, a reação cruzada verificada entre os diferentes sorovares pode dificultar o revelando do sorovar infectante.

A presença de anticorpos antileptospiras, muitas vezes, não reflete a real situação da infecção ou doença nos animais, estabelecendo somente a resposta imunológica do hospedeiro, que pode ser por contato prévio sem o desenvolvimento da infecção ou doença. Este fato pode ser verificado nesta pesquisa, em relação ao número de animais sorologicamente positivos e animais negativos na detecção de leptospira pelo cultivo e/ou Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), o que foi constatado pela fraca concordância da sorologia com a presença do agente nos tecidos estudados.

Estatisticamente, houve boa concordância dos resultados das técnicas de cultivo frente PCR de ambos os tecidos analisados. Porém, quando os resultados são analisados somente observando-se as amostras positivas, verifica-se que, do total das sete amostras positivas em fragmento de fígado e rim à técnica de PCR, três foram negativas ao cultivo, em ambos os tecidos, o que corresponde a 42,8% de negatividade, ou seja, a cultura detecta 42,8 vezes menos que a técnica de PCR.

O resultado da sensibilidade das duas técnicas de detecção do agente, tomando como base os animais positivos na sorologia, demonstrou maior sensibilidade da PCR frente ao cultivo. Este resultado tem sido comprovado em diversos estudos de comparação das técnicas (LILENBAUM et al., 2009).

Analisando-se conjuntamente os resultados obtidos nas três técnicas de diagnóstico realizadas, observaram-se os prováveis estágios de infecção nos ovinos estudados, baseando-se em estudo de Levett (2001): Dos 100 ovinos analisados, 75 animais foram negativos em todas as provas realizadas, indicando ausência de infecção;

13 animais foram positivos somente à sorologia, indicando provavelmente um contato anterior com o agente etiológico sem desenvolvimento da doença, ou ainda em fase posterior à convalescença, não mais portador renal, mas ainda com anticorpos detectáveis (memória imunológica).

Quatro animais apresentaram sorologia positiva, com técnica de cultivo e/ou PCR de rim positivos, provavelmente indicando que estes animais encontravam-se em fase crônica da infecção e colonização renal (portador renal) com anticorpos detectáveis; quatro animais apresentaram sorologia positiva, com a técnica de cultivo e/ou PCR de fígado positivo, provavelmente indicando que estes animais encontravam-se em fase aguda da infecção, em leptospiremia e com anticorpos detectáveis, mas ainda sem colonização renal.

Dois animais apresentaram sorologia positiva, com técnica de cultivo e/ou PCR de rim e fígado positivos, provavelmente indicando que estes animais encontravam-se em estágio final da fase aguda, ainda com leptospiremia, anticorpos detectáveis e colonização renal.

Apenas um animal apresentou sorologia negativa e cultivo e PCR de rim positivo, provavelmente indicando que este animal esteja infectado por um sorovar não presente na bateria de antígenos estudados à técnica Soroaglutinação Microscópica (SAM) utilizada neste trabalho, não apresentando reação cruzada para os sorovares testados, encontrando-se na fase de convalescência e portador renal.

Obtivemos ainda apenas um animal com sorologia negativa e cultivo e PCR de fígado positivos, provavelmente indicando que este animal encontrava-se em infecção recente, com leptospiremia, ainda sem anticorpos detectáveis e sem colonização renal.

Em relação ao provável estágio de infecção encontrado nos 23 animais sorologicamente positivos, nove ovinos (39,1%), com cultura e/ou PCR positivos em amostras hepáticas, apresentavam-se em fase aguda da infecção, o que poderia indicar que a infecção era constante nestas propriedades. Em relação aos 23 animais sorologicamente positivos, nove ovinos (39,1%) com cultura e/ou PCR positivos em amostras renais, apresentavam-se em fase crônica da infecção (portador renal), o que poderia indicar que estes animais pudessem atuar como reservatórios da doença, disseminando o agente ao meio ambiente, a outros animais e ao homem.

Portanto, neste trabalho pôde-se verificar que, frente às pesquisas avaliados o sorovar *Autumnalis* foi o mais importante nestes ovinos estudados, tendo-se 23% de animais sorologicamente positivos.

Embora hajam poucos estudos relacionados a isolamento de leptospiras em ovinos, o resultado apresentado, quando comparado a outros trabalhos, foi maior, e a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. conseguiu detectar os animais verdadeiramente infectados, demonstrando em que provável fase da infecção estes animais se encontravam, caracterizando a leptospirose como uma doença importante na espécie ovina, de caráter ocupacional.

Como medida de prevenção à leptospirose é necessário que se adotem medidas de manejo higiênico-sanitárias mais eficazes, a fim de evitar que a doença se instale nos rebanhos de ovinos, bem como ocorra a transmissão do agente para o meio ambiente e para os hospedeiros susceptíveis.

Para isto, mediante o diagnóstico positivo para leptospirose no rebanho, tendo em vista a proteção vacinal sorovar-específica, é importante utilizar vacinas para o rebanho contendo o maior número possível de sorovares presentes no rebanho ou na região específica de criação, ainda que a imunidade seja curta e sejam necessário doses de reforço (PUGH, 2004). Há também a necessidade de aplicação de antibioticoterapia na tentativa de eliminação dos portadores renais, visando à redução ou eliminação dos fatores de risco.

Evitar o contato de animais sadios com outras espécies possíveis portadoras de leptospiras; prevenir e/ou eliminar a população de roedores existente; evitar o acesso a água de superfície onde coabitam animais silvestres e, para a espécie ovina especialmente, promover o manejo separado de outras espécies de animais, como os bovinos, evitando a pastagem consorciada, são medidas passíveis de execução visando a não instalação da leptospirose no rebanho de ovinos. Desta forma, evitam-se prejuízos econômicos aos produtores, bem como previne-se a disseminação de leptospiras para o meio ambiente e para o homem. Portanto, é papel do médico veterinário na prevenção desta zoonose nos rebanhos, contribuindo, direta e indiretamente, para um estado sanitário de ótima qualidade e, conseqüentemente, na proteção da população humana susceptível.

6.0 REFERENCIAS

AHL, A. S., et al. 1992. *Leptospira* serology in small ruminants on St. Croix, U.S. Virgin Islands. **Annals of the New York Academy of Sciences.**,16: 168-71.

- AZEVEDO, S.S., et al. 2004a. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, 11: 167-170.
- AZEVEDO, S.S., et al. 2004b. Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. **Arquivo Instituto Biológico**. 71: 383–385.
- BHARTI, A., et al. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, 3: 757–771.
- BRASIL. 1999. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 98pp.
- CALDAS, E. M.; et al. 1986. Aglutininas antileptospira em ovinos e caprinos na região Nordeste do Estado da Bahia. **Arquivo Escola Medicina Veterinária Universidade Federal Bahia**, 8: 88-98.
- CARDOSO, M.V., et al. Determinação da condição sanitária de rebanhos caprinos e ovinos na região sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado, RS. **Anais...**Gramado: CONBRAVET, 2008. [Acesso em 12 de maio de 2009].
Disponível em: <<http://www.soreges.com.br/combravet2008/anais/cd/resumos/R06II-2.pdf>>.
- CORRÊA, WM.; CORRÊA, C.N.M. Leptospiroses. 1992. In: _____. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Medsi, cap.21, p.219-231.
- DORJEE, S., et al. 2008. Prevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep in a sheep-only abattoir in New Zealand, **New Zealand Veterinary Journal** 56: 164-170.
- ELLIS, W.A., et al. 1983. Positive involvement of leptospire in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. **Veterinary Record**, 26: 291-293.
- ELLIS, G. R.; et al. 1994. Seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo in merino stud rams in South Australia. **Australian Veterinary Journal**, 71: 203-206.
- ESCÓCIO, C.F., et al. 2008. Perfil sanitário de rebanhos ovinos criados exclusivamente ou consorciados com bovinos na região de Sorocaba-São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, Gramado, RS. **Anais...**Gramado: CONBRAVET, 2008. [Acesso em 18 maio 2009].
Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0693-2.pdf>>.

- FAINE, S. 1982. *Guidelines for the control of leptospires*. 2 ed. Geneva, World Health Organization, 171p. (Who offset publications, n. 67).
- FAVERO, A. C. M.; et al. 2002. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, 32: 613-619.
- HATHAWAY, S.C., et al. 1982. Serological survey of leptospiral antibodies in sheep from England and Wales. **Veterinary Record**, 110: 99–10.
- HEINEMANN, M.B.; et al. 2000. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, 73: 261-267.
- HERRMANN, G.P., et al. 2004. Soroprevalência da aglutininas anti-leptospira spp. em ovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, 34: 443-448.
- LANGONI, H.; et al. 1995. Pesquisa de aglutininas anti-leptospirosas em soros ovinos do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutinação em placa e soroprecipitação microscópica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, 17: 264-268.
- LEON-VIZCAINO., et al. 1987. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 10: 149-153.
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. 2001. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, 14: 296–326.
- LILENBAUM, W., et al. 2009. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, 87: 16–19.
- MELO, L.S.S, et al. 2010. Principais aspectos da infecção por *Leptospira* spp. em ovinos. *Ciência Rural*, Santa Maria, Maio, [Acesso em 25 mai 2010]. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782010005000072&lng=en&nrm=iso>.
- MÉRIEN, F.; et al. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 30: 2219-2224.
- OIE 2006. Leptospirosis, Chapter 2.2.4. World Organisation for Animal Health. [Acesso em 06 julh. 2009]. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm>.

- PASSOS, E.C., et al. 1988. Isolamento de leptospiros a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* serotipo Pomona. Emprego das técnicas da pipeta Pasteur e das diluições seriadas em meios de cultura de Fletcher tratado com 5-fluor-uracil ou o sulfato de neomicina. **Revista Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia/USP**, 25: 221-235.
- PUGH, D.G. 2004. In: **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo. Rocca, cap. 6, p. 203-204.
- SALABERRY, S.R.S. – 2010. **Epidemiologia das principais doenças infecciosas de ovinos do município de Uberlândia, MG**. Uberlândia, Dissertação (Ciências Veterinária – Saúde Animal), Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia, 72pp.
- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P. 1963. Aglutininas anti-leptospira em soros ovinos e caprinos no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, 30: 93-98.
- SHIMABUKURO, F.H.- 2007. **Avaliação sorológica e detecção molecular de leptospiros em tecidos de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola**. Botucatu, SP. Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 100 pp.
- SILVA, E.F., et al. 2007. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Veterinary Microbiology**, 12: 144-149.
- SILVA, R.C., et al. 2008. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging armadillos. **Veterinary Parasitology**, 157: 291–293.
- THIERMANN, A.B. 1984. Leptospirosis: Current developments and trends. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, 184: 722-725.
- VIDIC, B., et al. 2007. Infectious abortion in sheep. **Biotechnology in Animal Husbandry**, 23: 383-389.
- VIEGAS, E.A., et al. 1980. Aglutininas anti-leptospira em hemo-soro de caprinos e ovinos no estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, Salvador, 5: 20-34,.
- ZAMORA, J., et al. 1999. A serological survey of leptospirosis in sheep in Chile. **Revista Latinoamericana Microbiology**, 41: 73–76.

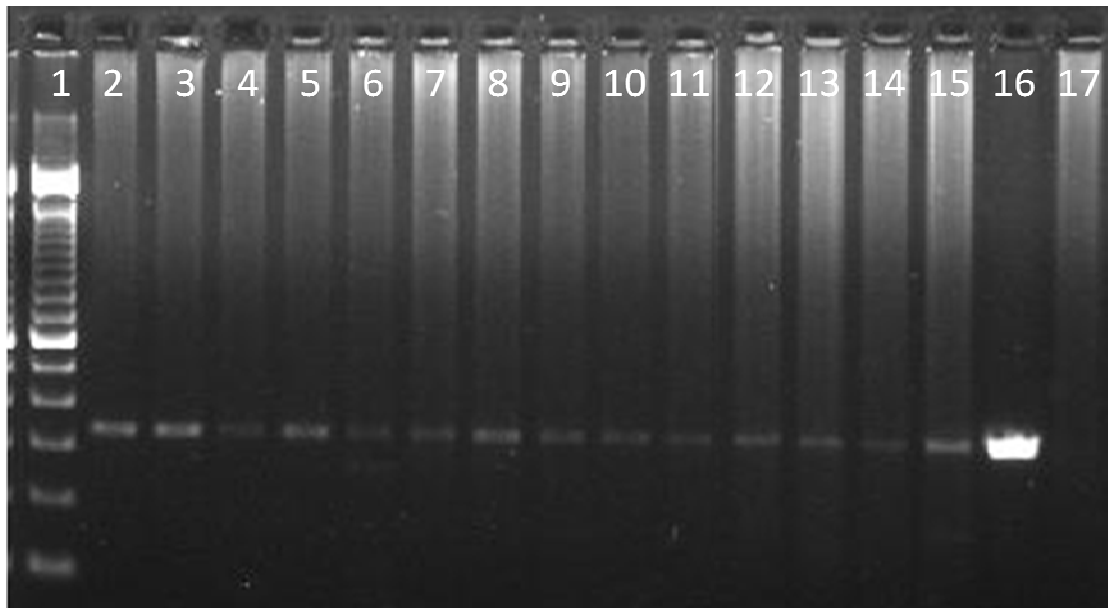


FIGURA 1 – Produtos de amplificação a partir dos fragmentos de fígado e rim de 12 ovinos, pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. de oito diferentes propriedades localizados no Estado de São Paulo. Legenda: 1- 331 pares de base (pb) (Invitrogen); 2- A1F; 3- A2F; 4- A2R; 5-G1F; 6-G2F; 7- H1F; 8-H1R; 9- H2F; 10-J1R; 11- M1R; 12- Q1R; 13- R1R; 14- R2R; 15- U1F; 16 – Controle Positivo; 17- Controle Negativo.

TABELA 1 - Distribuição de sorovares de *Leptospira* spp. em 23 ovinos reagentes à técnica de Soroglutinação Microscópica (SAM) e respectivos títulos de anticorpos e propriedades estudadas. Botucatu/SP, 2010.

Propriedade	Animais analisados/ reagentes	Soroavares											
		Autumnalis		Butembo	Castellonis	Djasiman	Grippothyphosa	Icterohaemorrhagiae	Wolffi	Patoc	Hardjo		
		100	200	1600	100	100	100	100	200	200	100	200	100
A	5/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	5/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	5/2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	5/2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
F	5/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	5/2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	5/2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	5/1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	5/3 ^a	1	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
M	5/3 ^b	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Q	5/1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
R	5/1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U	5/3 ^c	1	-	1	1	1	-	1	-	1	-	1	-
TOTAL		9	9	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2

^a Um animal reagente para dois sorovares, Autumnalis (200) e Butembo (100)

^b Um animal reagente para dois sorovares, Autumnalis (200) e Patoc (200)

^c Um animal reagente para dois sorovares, Autumnalis (100) e Castellonis (100) e outro para cinco sorovares, Autumnalis (1600), Butembo (100), Grippothyphosa (100), Icterohaemorrhagiae (200) e Patoc (100)

(-) animais não reagentes

*Normas para
Publicação*

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Instructions to Authors

The *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* is a multidisciplinary journal which publishes original research throughout the fields of tropical medicine (including pathology, field epidemiology and clinical studies) medical and veterinary parasitology (including protozoology, helminthology, entomology and malacology), and medical microbiology (virology, bacteriology and mycology). It particularly welcomes basic and applied research in biochemistry, immunology, molecular and cell biology, physiology, pharmacology and genetics related to these fields. Short communications are also considered. Review articles are invited. The journal publishes eight issues constituting one volume per year.

Occasionally papers presented at symposia or congresses are published as supplements. Submitted papers must be written in Portuguese or English. English of low quality is a major cause of delay in publication and we strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by someone with English as a first language, preferably a scientist.

Submission of a paper to the *Memórias* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Manuscripts will be peer-reviewed; acceptance will be based on scientific content and presentation of the material.

Submission of manuscripts will only be accepted when submitted electronically using the following link: <http://submission.scielo.br/index.php/mioc/login>.

With this service you can submit manuscripts, you will be able to check the content of your submission, the electronic

file will be used for editorial assessment and online refereeing, and the editorial decision on the manuscript will be communicated to you.

By using this service you will guarantee fast and safe submission of your manuscript, and speed the assessment process.

The manuscript should be prepared according to Author Guidelines

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that if accepted for publication, copyright of the article, including the right to reproduce the article in all form and media, shall be assigned exclusively to the Memórias. The journal will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce any contribution.

For other instructions the authors should consult and follow the most recent number of the Memórias or consult the homepage of the Memórias (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/>), or contact the Editorial Office by phones (+55-21-2598.4335/2561-1442), fax (+55-21-2280.5048), or e-mails (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) doublespaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and figures should come in separate documents.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author.s names: without titles or graduations

Intitutional affiliations: full address of the author only correspondent

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the source of funding or change of address

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution.s or a national research council.s guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge.

Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as .in press. and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as .unpublished observations.,

and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in

alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus. Consult: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>

. **In the text use authors, surname and date:** Lutz (1910) or (Lutz 1910)

With two authors it is: (Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912)

When there are more than two authors, only the first is mentioned: Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

Author Guidelines

. **At the end of the paper use the following styles:**

Journal article

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Book and Thesis

Forattini OP 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae), PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Chapter in book

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

Journal article on the Internet

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.amaassn.org/ama/pub/category/1736.html>

DATABASE ON THE INTERNET

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun

10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>

Files updated weekly. Updated June 15, 2005

. **Illustrations:** figures and tables must be understandable without reference to the text.

Figures presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted,

and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be

indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures

should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow

inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour

photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from

their manuscript for consideration for the cover

- Tables should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive

title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

. **Short communications** should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three

printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the

end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

. **Alternative format:** manuscripts may be submitted following the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to

Biomedical Journals. produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver

Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or

at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript

where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication. Authors should also follow the

Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

. an **affidavit**, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions

may sign in different sheets containing the same basic statement.

. a **copyright** assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.

.Page charges: there will be no page charges.

.Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the

stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.