

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU**

**SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA
LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DE FAZENDAS DE CRIA E DE CENTRAIS
DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO DA REGIÃO DE BAURU- SP**

GABRIELA PACHECO SÁNCHEZ

Botucatu – SP

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU**

**SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA
LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DE FAZENDAS DE CRIA E DE CENTRAIS
DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO DA REGIÃO DE BAURU- SP**

GABRIELA PACHECO SÁNCHEZ

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

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sánchez, Gabriela Pacheco.

Soroprevalência, isolamento e diagnóstico molecular para leptospirose em bovinos de fazendas de cria e de centrais de receptoras de embrião da região de Bauru - SP / Gabriela Pacheco Sánchez. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Capes: 50502000

1. Bovino - Doenças. 2. Leptospirose em animais. 3. Estudos Soroepidemiológicos. 4. Zoonoses. 5. Diagnóstico molecular.

Palavras-chave: Bovinos; Diagnóstico ; Leptospirose; Zoonoses.

Nome do autor: Gabriela Pacheco Sánchez

Título: SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR
PARA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DE FAZENDAS DE CRIA E DE
CENTRAIS DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO DA REGIÃO DE BAURU- SP

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

APTA – Centro Oeste - Bauru

Prof. Dr. Helio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Márcia Marinho

Membro

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

FMVA – UNESP – Araçatuba

Data de defesa: 20 de Abril de 2016.

DEDICATORIA

Dedico,

A Deus, por me dar forças, coragem e ânimo para ter chegado sem queixa nenhuma onde estou.

A minha família, pelo amor, paciência e apoio incondicional. Especialmente a minha mãe, quem confia cegamente em minhas capacidades e decisões. Todo o que eu sou devo a você. Amo você!

AGRADECIMIENTOS

Agradeço

A equipe da APTA – Bauru, por cada risada, cada “vai dar certo”, cada “tá ruim mas tá bom”, cada confraternização, cada café da tarde, cada festinha, e especialmente por todos os “Bom dia” animados; fico agradecida por ser parte dessa família.

A equipe do LASAB, pela amizade, disponibilidade, risadas e pelo companheirismo; por deixarem os melhores ensinamentos do que é trabalhar em equipe. Maria Fernanda, Mirian, Lívia, Wesley, Dani, Fábio e Amanda obrigada por tudo! ☺

A Lina, Juliana e Diego, poucas pessoas entendem esse sentimento de querer dar tudo de si, mesmo sem ter certeza que o resultado valerá a pena, nós compartilhamos isso. Meus queridos colombianos, obrigada pela amizade tão acolhedora e pela força nos momentos mais sensíveis. Hasta luego!.

A Chris Pinto, minha orientadora no Peru e minha amiga, uma das primeiras pessoas que me incentivou a querer estudar fora, sem a motivadora primeira conversa de 2012 talvez essa tese nem existisse.

Especialmente a minha orientadora, Dra. Simone Baldini Lucheis, pela receptividade desde o primeiro e-mail, definitivamente sem você não teria como ter vivido esses loucos e sábios dois anos. Muito obrigada pela confiança, disponibilidade e carinho, e que venham mais parcerias Peru – Brasil!

“Quando temos conhecimento de que somos os únicos responsáveis pelo nosso fracasso, fica mais fácil compreender que também somos os únicos responsáveis por nossa felicidade.”

Taty Ferreira

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Soropositividade dos bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP, por sorovar, à prova de SAM. Botucatu, SP, 2016.....	56
Tabela 2 - Titulação de bovinos reagentes à prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), em fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	57
Tabela 3 - Soroaglutinação Microscópica (SAM), em fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP, segundo as fazendas avaliadas. Botucatu, SP, 2016.....	58
Tabela 4 - Soroaglutinação Microscópica (SAM), em fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP, segundo o sexo. Botucatu, SP, 2016.....	59
Tabela 5. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) das culturas negativas ao crescimento em meio Fletcher sob microscópio de campo escuro. Botucatu, SP, 2016.....	59
Tabela 6. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	60
Tabela 7. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) do sêmen dos touros de fazendas de cria na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	60
Tabela 8. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) das culturas de sêmen dos touros de fazendas de cria na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	60
Tabela 9. Teste exato de Fisher entre a SAM e a PCR dos bovinos de fazendas de cria e vacas de centrais receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	61
Tabela 10. Teste exato de Fisher entre a PCR do sangue e das culturas do sangue, dos bovinos de fazendas de cria e vacas de centrais receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	62
Tabela 11. Teste exato de Fisher entre a PCR das culturas do sêmen e do sêmen dos bovinos de fazendas de cria na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	62

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Número de animais procedentes de Centrais de receptoras e fazendas de cria, da região de Bauru, amostrados para diagnóstico de leptospirose. Botucatu, SP, 2016.....	46
Quadro 2 - Bateria de sorovares de <i>Leptospira</i> spp. incluídos no estudo. Botucatu, SP, 2016.....	48
Quadro 3 - Principais estudos de soroprevalência de leptospirose bovina no Brasil.....	67

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - <i>Leptospira</i> spp. sob microscopia eletrônica.....	28
Figura 2 - A leptospirose em suas fases clínicas em correlação com os momentos de coleta de amostra.....	37
Figura 3 - Distribuição dos resultados da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), em bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	54
Figura 4 - Sorovares reagentes à técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.....	55
Figura 5 - Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Resultados da amplificação dos genes rrs (16S) de 13 amostras das culturas de sêmen dos touros de fazendas de cria na região de Bauru – SP. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de <i>Leptospira</i> spp. nas amostras 3 e 4. Controle positivo: <i>Leptospira interrogans</i> sor. Copenhageni. Controle negativo: água mili Q.....	63

LISTA DE
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
M	molar
mM	milimolar
mL	mililitros
mm	milímetros
uL	microlitros
mg	miligramas
g	gramas
ug	microgramas
pH	potencial hidrogeniônico
SAM	Soroaglutinação Microscópica
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Rotações por minuto
WHO	World Health Organization
TE	TrisEDTA
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1 Biologia das Leptospiras.....	28
2.2 Taxonomia e Classificação.....	29
2.2.1. Classificação sorológica.....	29
2.2.2. Classificação molecular.....	29
2.3 Patogenia.....	30
2.3.1. Fatores de virulência.....	31
2.4 Epidemiologia.....	32
2.4.1. Nos bovinos.....	34
2.5 Imunidade e Vacinas.....	35
2.6 Diagnóstico.....	36
2.6.1. Exame microscópico.....	37
2.6.2. Isolamento do agente bacteriano.....	38
2.6.3. Exames sorológicos.....	38
2.6.4. Exames moleculares.....	39
2.7 Tratamento.....	40
2.8 Prevenção.....	41
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Gerais.....	43
3.2 Específicos.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Cálculo do tamanho amostral.....	45
4.2 Coleta de amostras.....	46
4.2.1. Sangue.....	46
4.2.2. Sêmen.....	46
4.3 Exames diagnósticos.....	47
4.3.1. Soroaglutinação Microscópica (SAM).....	47
4.3.2. Cultura em meio de Fletcher.....	50
4.3.3. Reação em Cadeia pela Polimerase.....	50
4.3.3.1. Preparo das amostras para extração do DNA.....	50

4.3.3.2. Extração e purificação do DNA.....	51
4.3.3.3. Amplificação do DNA.....	51
4.3.3.4. Eletroforese.....	52
4.3.3.5. Controles.....	52
4.4 Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Isolamento.....	54
5.2 Exame sorológico.....	54
5.3 Exame molecular.....	59
5.4 Comparação dos testes diagnósticos.....	61
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÕES.....	72
8 BIBLIOGRAFIA.....	74
9 TRABALHO CIENTÍFICO.....	88
10 ANEXOS.....	101
11 APÊNDICE.....	108

RESUMO

SANCHÉZ, G.P. **Soroprevalência, isolamento e diagnóstico molecular para leptospirose em bovinos de fazendas de cria e de centrais de receptoras de embrião da região de Bauru- SP.** Botucatu, 2016. 125 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de grande impacto mundial na saúde animal e saúde pública. Esta doença tem como agente infeccioso as espiroquetas do gênero *Leptospira* spp., com espécies patogênicas e não patogênicas. Em animais de produção como os bovinos o quadro clínico manifesta-se geralmente com falhas reprodutivas, como abortos e infertilidade, ocasionando prejuízo econômico nas fazendas, além de representar risco à saúde dos trabalhadores que lidam direta ou indiretamente com os animais. Com o intuito de avaliar o estado sanitário da leptospirose nos bovinos reprodutores de centrais de receptoras de embrião e fazendas de cria da região de Bauru, foram analisadas 400 amostras de sangue e soro destes animais mediante os seguintes testes diagnósticos: cultura em meio de Fletcher, técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Os resultados indicaram todas as culturas negativas à visualização de formas espiroqueteadas. Porém, a análise sorológica mediante SAM, indicou soroprevalência de 83% (331/400); sendo que o sorovares mais frequentes pertencem ao sorogrupo Sejroe (Hardjoprajitno (71,6%), HardjoCTG (62,8%), Wolffi (60,1%) e Hardjo (45,6%). À PCR de sangue, encontraram-se três (0,7%, 3/400) animais positivos, os quais foram negativos à SAM, indicando estarem na fase aguda da doença. À PCR do sêmen, encontraram-se três (8,1%, 3/37) animais positivos, indicando a probabilidade de transmissão sexual de leptospirose nas fazendas de cria. A alta porcentagem de animais positivos ao sorogrupo Sejroe à técnica de SAM, bem como os altos títulos observados, demonstraram concordância com outros estudos realizados em bovinos no Brasil e relatados na revisão de literatura. Com este estudo ratifica-se a grande e preocupante disseminação destes sorovares nos bovinos reprodutores da região, recomendando-se adotar medidas profiláticas como vacinação sistemática, tratamento de animais e melhoramento das condições higiênico-sanitárias das fazendas avaliadas; para consequentemente minimizar os fatores de risco de infecções aos humanos em contato com esses animais.

Palavras-chave: Leptospirose, zoonose, bovinos, diagnóstico.

ABSTRACT

SANCHÉZ, G.P. **Seroprevalence, isolation and molecular diagnosis for bovine leptospirosis in meet cattle and embryo receptors bovine centers from Bauru region – SP.** Botucatu, 2016. 125 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide zoonosis of great impact in animal and public health. The etiological agent of this disease are spirochetes of genus *Leptospira* spp., classified in pathogenic and nonpathogenic species. In farm animals, such as cattle, the clinical presentation involves reproductive failure, like abortion and infertility, causing economical losses in farms, furthermore represents a health risk for workers who keep direct or indirect contact with these animals. Aiming to evaluate the sanitary state of leptospirosis in reproductive cattle of embryo receptors centers and meet cattle farms of Bauru, 400 blood samples were analysed with three diagnostic tests: Cultured in Fletcher medium, Microagglutination test (MAT) and Polymerase Chain Reaction (PCR). Results shown all cultures negative to visualization of spirochetes forms. However, serological analysis indicated a prevalence of 83% (331/400), with greater frequency of serovars from serogroup Sejroe (Hardjoprajitno (71.6%), HardjoCTG (62.8%) and Hardjo (45.6%)). Blood PCR showed three (0.7%, 3/400) positive animals, who were also negative to MAT, concluding they were in the acute phase of the disease. PCR of semen showed three (8.1%, 3/37) positive animals, suggesting the chance of leptospirosis' sexual transmission in the meet farms evaluated. High percentage of positive animals to serogroup Sejroe in MAT, as to the high titres observed, showed concordance to several other studies performed in cattle from Brazil and described in the literature. In this study, we confirm the great and concerning dissemination of these serovars in reproductive cattle from the region, recommending the adoption of prophylactic measures, such as systemic vaccination, treatment of animals and improvement of hygienic-sanitary conditions; to consequently minimize risk factors for this infection to humans in contact with these animals.

Key words: Leptospirosis, zoonosis, bovines, diagnostic

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por membros do gênero *Leptospira* spp., que inclui mais de 16 espécies geneticamente identificadas e mais de 260 sorovares, categorizados em sorogrupos (LEVETT, 2004). Esta zoonose tem um grande impacto na saúde animal e saúde pública a nível mundial (ACHA e SZYFRES, 2003).

O agente infeccioso desta doença pertence à ordem *Spirochaetales* e à família *Leptospiraceae*. Trata-se de bactérias helicoidais, móveis pela presença de flagelos localizados no interior do periplasma e com extremos em forma de ganchos. Não são coradas adequadamente pela técnica de Gram, mas poderiam ser classificadas como gram-negativas pelas características morfológicas. São facilmente encontradas em ambientes aquáticos, mas o isolamento em laboratório é laborioso porque requer um tempo prologado e nem sempre é satisfatório; portanto, utiliza-se como padrão ouro o teste sorológico de Soroaglutinação Microscópica (SAM) (ADLER DE LA PENA e MOCTEZUMA, 2010).

Humanos e outros animais podem-se infectar de forma direta pelo contato das mucosas e/ou pele com leptospiros presentes na urina e, de forma indireta, ao beber água e alimentos contaminados. Os reservatórios envolvidos na transmissão da enfermidade compreendem uma variedade de animais domésticos, tais como bovinos, ovinos, caprinos, suínos, equinos, caninos e felinos, bem como animais silvestres (BRASIL, 1995; MARTINS et al., 2012)

Na saúde pública a leptospirose é caracterizada como uma doença ocupacional e recebe diferentes denominações segundo as condições nas quais a transmissão é produzida. O grau e natureza da exposição dependem muitas vezes das atividades ocupacionais e/ou atividades recreativas e sociais. Os trabalhadores das fazendas que lidam diretamente com os animais podem-se infectar durante suas atividades laborais – manipulando fetos abortados, envoltórios fetais, ou entrando em contato direto com a urina dos animais infectados (ACHA e SZYFRES, 2003).

No Brasil, a leptospirose é endêmica e é considerada um dos maiores problemas de saúde pública, tendo sido notificados 34 532 casos de enfermidade no período entre 2007 a 2015 (MINISTERIO DA SAUDE, 2015). A taxa de mortalidade da doença de Weil (forma grave) e da síndrome hemorrágica pulmonar severa é de >10% e 74%, respectivamente (McBRIDE et al., 2005; GOUVEIA et al., 2008). Alguns estudos sugerem que a leptospirose pode representar entre 20 a 40% das doenças febris de origem desconhecida (ABELA-RIDDER et al., 2010).

No mundo, a leptospirose tem sido reportada como uma das maiores causas de falhas reprodutivas nos bovinos e em outros ruminantes, trazendo perdas econômicas que decorrem de transtornos reprodutivos como infertilidade, aborto, nascimento de bezerros fracos e diminuição temporária da produção leiteira (MARTINS et al., 2012). No Brasil, tem se estimado que ao redor de 30% do rebanho bovino apresentaram falhas reprodutivas a cada ano (BARUSELLI et al., 2012). Ainda que a importância das doenças infecciosas de caráter abortivo nas manifestações clínicas não tenha sido quantificada claramente, é óbvio que estas doenças representam uma causa importante das falhas reprodutivas, principalmente nos países em desenvolvimento (TSCHOPP et al., 2013).

A soroprevalência da leptospirose em rebanhos bovinos brasileiros varia de 39% a 100%, sendo o clima da região de estudo um fator epidemiológico relevante. Os inquéritos realizados evidenciam como importantes principalmente os sorovares Hardjo, Wolffi, Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Canicola, sendo mais prevalente o primeiro (LANGONI et al., 2000; FIGUEREIDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; HERMANN et al., 2012; SILVA et al., 2012). A doença nos bovinos é geralmente de caráter crônico, apresentando-se como distúrbios reprodutivos. Os sinais clínicos da doença tipo aguda são mais evidentes nos animais jovens do que nos adultos, sendo mais frequente a mortalidade em bezerros (LILENBAUM e MARTINS, 2014).

Mediante diagnóstico molecular, tem se detectado a presença de *Leptospira* spp. em amostras de sangue, urina, sêmen e em secreções vaginais, caracterizando-se como uma doença reprodutiva em animais de produção. As leptospirosas podem ser isoladas do trato genital de touros sem manifestações clínicas e transmitida pelo sêmen (BONDURANT, 2005). Heineman et al. (1999) realizaram um estudo em touros procedentes de centros de inseminação artificial, obtendo-se 80% (16/20) de touros amostrados positivos a *Leptospira* spp. à PCR.

Diferentes autores discutem que a melhor maneira de reduzir a soropositividade nos animais seria a adoção de medidas ambientais preventivas, como evitar o acesso dos animais a fontes de água de procedência duvidosa, as quais possam ser fonte de infecção; além disso, assumir outras medidas de controle, tais como vacinação periódica dos animais e tratamento com drogas específicas (VARGES et al., 2009).

Devido à importância desta zoonose para o rebanho bovino e aos problemas reprodutivos associados a ela, além da sua importância pelas perdas econômicas e pela relevância em saúde pública, pretende-se com este estudo avaliar a presença da leptospirose em bovinos de fazendas de cria e em centrais de receptoras de embrião da região de Bauru – SP. Tendo em vista que até o nosso conhecimento não há trabalhos desta natureza na região, o presente estudo permite a identificação de animais positivos tanto à sorologia bem como pelo isolamento em meio de Fletcher e pela análise molecular a partir de sangue e sêmen, verificando-se animais carreadores da bactéria nos rebanhos estudados; a partir daí, possibilita-se a necessidade da realização de controle no rebanho acometido, pela indicação de tratamento dos animais e vacinações periódicas, como chave para o controle da infecção no rebanho.

REVISÃO DE
LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biologia das leptospiros

O nome da bactéria deriva-se do grego *leptos* (fino) e do latim *spira* (enroscado). O gênero *Leptospira* spp. está conformado por espiroquetas de dupla membrana celular, finas (6-20 μm de longitude e 0.1 μm de diâmetro), flexíveis, moveis e de forma espiral (CULLEN et al., 2004; EVANGELISTA e COBURN, 2010). Estas bactérias possuem extremos característicos em forma de ganchos. A motilidade deve-se à rotação dos flagelos axiais insertados nos extremos opostos das bactérias, estendendo-se pelo espaço periplásmico (região central) (ACHAS e SZYFRES, 2003; PICARDEAU, 2013). São visualizadas por microscopia de campo escuro e microscopia de contraste de fases, aparecendo como espiroquetas em ativo movimento.



Figura 1. *Leptospira* spp. sob microscopia eletrônica. Fonte: Picardeau, 2013.

Entre outras características, descreve-se que são bactérias aeróbias obrigatórias e crescem sob temperatura de 28-30 °C em meios líquidos ou semissólidos, os quais possuem nutrientes como vitaminas B1 e B12, ácidos graxos, aminoácidos e sais minerais. Além disso, os meios requerem a adição de albumina bovina e/ou soro de coelho para o ótimo crescimento (FAINE et al., 1999; PICARDEAU, 2013).

As leptospiros patogênicas não se reproduzem fora do hospedeiro e são rapidamente inativadas quando expostas ao calor excessivo, radiação ultravioleta, desinfetantes e a temperaturas de congelamento. Porém, quando as condições são ótimas, podem sobreviver na água e no solo úmido durante semanas até meses (FAINE et al., 1999; ACHA e SZYFRES, 2003; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

2.2. Taxonomia e classificação

O gênero *Leptospira* era classificado inicialmente em duas espécies: *Leptospira interrogans* sensu lato (espécies patogênicas) e *Leptospira biflexa* sensu lato (espécies saprófitas). Estes dois grupos diferem na capacidade patogênica, os requerimentos nutricionais e em outras propriedades fenotípicas (JOHNSON e ROGERS, 1964). A classificação atual é a de genomoespécies (patogênicas, intermediárias e saprófitas), sendo que as características que diferenciavam *L. interrogans* sensu lato de *L. biflexa* sensu lato não tem mais relevância (LEVETT, 2004).

2.2.1. Classificação sorológica

Mediante o teste de aglutinação microscópica com absorção cruzada (Cross-agglutinin absorption test - CAAT) conseguiu-se a diferenciação em sorovares, os quais até hoje em dia são considerados o sistema unitário básico para *Leptospira* spp.. Os sorovares que são antigenicamente semelhantes são agrupados em sorogrupos, principalmente por conveniência para os estudos (KMETY e DIKKEN, 1993; LEHMANN et al., 2014).

Até agora tem sido descritos aproximadamente 250 sorovares patogênicos, sendo a lista atualizada periodicamente (CORNEY et al., 2008; VALVERDE et al., 2008; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; SEDIGHEH et al., 2010; DAS NEVES PAIVA-CARDOSO et al., 2013). Os últimos sorovares adicionados à lista são *L. kirschneri* sorovar Altodouro, *L. santarosai* sorovar Corredores e *L. santarosai* sorovar Costa Rica (LEVETT e SMYTHE, 2014).

2.2.2. Classificação molecular

A classificação genotípica das leptospiros baseia-se em eletroforese de enzimas multiloco (MLEE) e análise da sequência 16s do rRNA (HOOKEY E GATEHOUSE, 1993). Na reunião do Subcomitê de Taxonomia de *Leptospiraceae* de 2007 em Quito, Equador, agregaram-se 4 genomoespécies à lista das espécies de leptospiros patogênicas, resultando em treze: *L.*

alexanderi, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* y *L. wolffii* (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A correlação entre a classificação sorológica e a molecular é quase nula, já que em um mesmo sorogrupo pode encontrar-se mais de uma espécie. Por conseguinte, os sistemas de classificação baseados em semelhanças genéticas podem ser usados em conjunto com a classificação antigênica (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009).

2.3. Patogenia

As leptospiplas podem ingressar ao organismo via membranas mucosas ou pela pele quando a integridade da mesma for comprometida por cortes, lesões (macro ou micro) e/ou imersão em água (ADLER, 2014). Posteriormente, invadem rapidamente o fluxo sanguíneo, causando como lesão primária o rompimento da integridade das membranas celulares endoteliais, levando a hemorragias e escapes vasculares. As hemorragias petequiais podem ser aparentes em todos os órgãos e tecidos (RAO et al., 2003).

O período de incubação é de aproximadamente 7 a 14 dias. Após passar pela corrente sanguínea, as leptospiplas colonizam preferentemente os rins e o fígado, pela grande quantidade de lipídeos (ácidos graxos) que possuem estes órgãos; e, em menor proporção, colonizam pulmões, pericárdio e gônadas (RAO et al., 2003; JANWITTHAYANAN et al., 2013).

As espiroquetas tem a capacidade de persistir em órgãos imunológica e anatomicamente privilegiados, logo depois da ação dos anticorpos e fagócitos em outros órgãos. O sitio anatômico predileto são os túbulos proximais renais, onde podem permanecer até quatro semanas após uma infecção aguda em humanos e de maneira intermitente por anos em animais (LEVETT e HAAKE, 2010). Tem se relatado também a presença de leptospiplas em secreções como sêmen e fluidos vaginais, indicando a presença dela nas gônadas (LILENBAUM et al., 2008; HAMOND et al., 2014).

2.3.1. Fatores de virulência

Os mecanismos pelos quais as leptospiros ocasionam a doença não estão completamente entendidos. Porém, entre os potenciais mecanismos de patogenicidade temos a resposta do sistema imune, a produção de toxinas, adesinas, lipoproteínas e outras proteínas da membrana externa (GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2012).

O lipopolissacarídeo (LPS) leptospiral é semelhante tanto química quanto imunologicamente ao LPS das bactérias Gram negativas. Entretanto, tem sido demonstrado que é menos ativo e/ou tóxico em exames de atividade de endotoxina (ADLER, 2014). Outras proteínas com um papel muito importante no dano endotelial são as hemolisinas, collagenases e proteases, encontradas especificamente em *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* (XUE, YAN e PICARDEAU, 2009).

A motilidade bacteriana ocupa o maior papel no desenvolvimento da leptospirose. A habilidade para avançar rapidamente em ambientes desfavoráveis contribui ao ingresso destas espiroquetas pelas células epiteliais (CHARON e GOLDSTEIN, 2002). As proteínas da membrana podem atuar como mediadores na aderência às células hospedeiras ou à invasão aos tecidos. Estas proteínas podem ser ou lipoproteínas ou proteínas de membrana integrais (CULLEN, HAAKE e ADLER, 2004).

O genoma de *Leptospira* spp. contém mais de 150 genes que codificam lipoproteínas; dentre estes se tem os genes Lig (ligA, ligB e ligC) que codificam proteínas de membrana com função na adesão aos tecidos do hospedeiro, atuando também como antígenos primários (CHOY et al., 2007). A lipoproteína mais importante e conhecida, LipL32, está altamente conservada dentre os sorovares patogênicos. Outras lipoproteínas conhecidas são LipL21 e LipL41 (XUEN, JAN e PICARDEAU, 2009). A proteína LenA, endostatina-simile, junta-se ao fator H, fator regulador do complemento; sugerindo um papel importante na resistência ao soro (STEVENSON et al., 2007).

As proteínas integrais de membrana externa (OMPs) tem um papel chave na patogenia da leptospirose, devido a que atuam como alvos antigênicos e de adesão para os anticorpos bactericidas, receptores celulares e/ou porinas. O primeiro grupo de OMPs geneticamente definido em *Leptospira* spp. foi a lipoproteína de superfície OmpA-simile, Loa22 (RISTOW et al., 2007). Esta lipoproteína está bastante conservada tendo a sua expressão regulada na infecção aguda da doença (EVANGELISTA e COBURN, 2010).

Recentemente, tem se identificado 4 novas OMPs: OmpL36, OmpL37, OmpL47 e OmpL54, mas os papéis destas proteínas na virulência da bactéria não tem sido descrito (PINNE e HAAKE, 2009). Lsa66 é outra proteína OmpA-simile atualmente descrita, tem dupla atividade (adesão e invasão), sugerindo uma função na patogenia da leptospirose (OLIVEIRA et al., 2011).

O ferro é essencial para a viabilidade de muitas espécies bacterianas, por conseguinte, a captação do mesmo pela bactéria é considerada um fator de virulência. As leptospirosas patogênicas possuem a Heme oxigenase, HemO, a mesma que facilita a aquisição de ferro do Heme (maior fonte de ferro) (MURRAY et al., 2008).

2.4. Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, presente tanto em áreas urbanas como em áreas rurais, em climas tropicais e subtropicais. Diferentes condições climáticas e sociais favorecem o incremento e distribuição da doença, como chuvas intensas, alta densidade populacional em condições de pobreza e ausência de serviços sanitários (CAMPAGNOLO et al., 2000; BHARTI et al., 2003; WHO, 2003; PICARDEAU, 2013).

A infecção ocorre por contato direto com urina ou outros fluidos corporais de animais infectados, como descargas uterinas pós-aborto, feto, placenta infectada, infecções uterinas e sêmen (ELLIS, 1994) ou por contato indireto com solo, pastagem, água e/ou alimentos contaminados com urina de hospedeiros de manutenção (agentes disseminadores das bactérias) ou com

fluidos corporais de hospedeiros acidentais (que desenvolvem a doença) (LEVETT, 2004; PICARDEAU, 2013).

O risco humano de contrair a enfermidade é principalmente ocupacional (trabalhadores de plantações de arroz, trabalhadores de plantações de cana de açúcar, trabalhadores de abatedouros, trabalhadores de esgotos, de lixeiros, etc.), além de estar associado a atividades recreativas (natação, rafting e pesca) e às catástrofes naturais (enchentes, ciclones, etc.). Em países desenvolvidos a doença tem alcançado importância por estar relacionada ao turismo de aventura e atividades aquáticas, devido ao contato com água contaminada com urina de animais infectados (PICARDEAU, 2013; DUPOEY et al., 2014; DREYFUS et al., 2015).

Os hospedeiros de manutenção podem ser os animais que não apresentam sinais clínicos da doença aguda, mas nos quais as leptospiros conseguiram colonizar os rins; destaca-se o papel dos roedores como principal reservatório e agente disseminador, excretando leptospiros ao meio ambiente via urina. Como hospedeiros acidentais (que desenvolvem a doença) tem-se uma ampla variedade de animais (domésticos e de produção) e humanos, além dos animais silvestres (JOBBS e ALEXANDER, 2015). A doença manifesta-se geralmente com problemas reprodutivos em bovinos, suínos, caprinos, equinos e ovinos; uveíte recorrente em equinos ou com quadros agudos sistêmicos em caninos e humanos (LEVETT e HAAKE, 2010; PICARDEAU, 2013). Em felinos a doença parece ser rara, porém, estes animais uma vez infectados podem eliminar leptospiros na urina (SCHULLER et al., 2015).

De modo geral, cada sorovar está adaptado a determinados hospedeiros; no entanto, um organismo pode ser infectado com mais de um sorovar (HARTSKEEL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011). Há diferentes variações dentro dos hospedeiros de manutenção e os sorovares que os transmitem; o conhecimento dos sorovares prevalentes e os seus hospedeiros

de manutenção é essencial para o melhor entendimento da epidemiologia da doença (LEVETT, 2004; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

2.4.1. Nos Bovinos

Nos bovinos a doença manifesta-se geralmente com uma tendência à cronicidade, caracterizando-se por problemas reprodutivos, como abortamentos (principalmente no primeiro trimestre da gestação), nascimento de bezerros fracos, diminuição do crescimento destes bezerros e diminuição da produção leiteira. No entanto, os casos agudos apresentam-se mais usualmente em bezerros, o que pode levá-los a óbito. Todos os sinais clínicos mencionados repercutem grandemente na economia das fazendas, destinando recursos para gastos de tratamento (GROOMS, 2006; LILENBAUM e MARTINS, 2014).

O sorovar Hardjo é geralmente o mais prevalente nos rebanhos bovinos, transcorrendo geralmente de maneira subclínica, e isto já é esperado devido à adaptação deste sorovar a esta espécie animal. No entanto, tem-se reportado prevalências significativas para outros sorovares, como Wolffi, Butembo e Grippothyphosa (MINEIRO et al., 2007, TONIN et al., 2010; SALGADO et al., 2014).

Infecções incidentais causadas por outros sorovares procedentes de outros animais domésticos e de animais silvestres são mais dependentes de fatores ambientais e práticas de manejo, o que resultará no contato direto ou indireto do animal com a urina destes animais reservatórios, levando a um quadro agudo e severo de leptospirose, geralmente pelo sorovar Pomona em bovinos ou Icterohaemorrhagiae em humanos ou cães (MACIEL et al., 2008; MARTINS et al., 2012).

Os estudos conduzidos no Brasil têm reportado prevalências variáveis, dependendo dos animais amostrados e da região do Brasil onde foi conduzido o experimento. Langoni et al. (2000) encontraram uma prevalência de 69,3% sendo que este estudo foi feito no estado de São Paulo, considerando-se sete

cidades do interior paulista, incluindo Bauru. Já Figueiredo et al. (2009) relataram uma prevalência de 98,8% em fêmeas bovinas no Mato Grosso do Sul. Oliveira et al. (2009) evidenciaram uma prevalência de 77,9% em fêmeas bovinas do estado de Bahía. Hermann et al. (2012) detectaram no Rio Grande do Sul uma prevalência de 38,8% em bovinos em idade reprodutiva; e por último, Silva et al. (2012) detectaram uma prevalência de 35,9% no estado do Maranhão.

A identificação dos sorogrupos prevalentes e de seus reservatórios é essencial para a compreensão da interação agente, hospedeiro e meio ambiente em condições tropicais (MARTINS e LILENBAUM, 2013). Um dos fatores que também influencia a variabilidade das prevalências reportadas, além dos já mencionados, é a bateria de sorovares com os quais realiza-se a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM). Pinto et al. (2015) relataram que, a técnica de SAM apresenta um aumento significativo na sensibilidade se forem utilizados sorovares locais como antígenos na detecção da leptospirose bovina.

2.5. Imunidade e vacinas

A resposta imune inicial é de tipo inata reconhecendo antígenos próprios da bactéria, tais como o LPS das leptospiros, por meio de receptores tipo Toll (TLR) - TLR2 e TLR4. Estes receptores ativam os fatores do núcleo, como NF- κ B, que induzem a produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) e do fator de necrose tumoral (TNF). Esta resposta inicial inata é descrita na doença apesar das leptospiros evadirem a fagocitose e o complemento (RAO et al., 2003, HARTSKEEL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011; ADLER, 2015).

A resposta imune na leptospirose é predominantemente de tipo humoral. Muitos estudos demonstraram que esta imunidade pode ser transferida passivamente por humanos convalescentes ou soro animal, bem pelo antissoro produzido experimentalmente ou pelos anticorpos monoclonais (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O organismo consegue gerar uma resposta específica contra o sorovar infectante, mediante a produção de anticorpos IgM

e IgG, além da produção de interferon gama e a resposta associada às células T4 (CD4+) (BERNARDI et al., 2012; GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2012).

As vacinas para humanos e animais são usadas desde 1920; quase todas elas eram preparadas com leptospiros inativadas por uma variedade de métodos, como calor, formalina, fenol, irradiação, etc. (FAINE et al., 1999). Na atualidade existem diversas vacinas contra a leptospirose, as mais conhecidas são as vacinas inativadas, que são emulsões com mínimo três sorovares (KOIZUMI e WATANABE, 2005).

As vacinas são sorovar específicas e protegem durante um curto período de tempo; por isso a revacinação é necessária para manter os títulos de anticorpos protetores. Estas vacinas estão focadas na situação local da doença e não representam a realidade de outras áreas com outros sorovares endêmicos (WHO, 2003; OIE, 2013).

Entretanto, em relação a cenário epidemiológico da leptospirose, vale ressaltar que o mesmo não representa o que realmente ocorre em muitas partes do mundo, principalmente nas regiões tropicais, onde a doença é endêmica. Particularmente em relação a bovinos, o conhecimento atual sobre a epidemiologia e controle, bem como as ferramentas de diagnóstico disponíveis e as vacinas comerciais, podem não ser adequadas para as diferentes localidades, o que leva a um cenário frustrante de endemicidade e dificuldades no controle da doença e, provavelmente, a leptospirose permanecerá endêmica nos países em desenvolvimento, levando a riscos econômicos importantes na produção animal e os riscos para a saúde pública nessas regiões (LILENBAUM e MARTINS, 2014).

2.6. Diagnóstico

Tendo em vista que a infecção abrange muitos sinais clínicos, o diagnóstico definitivo da doença é laborioso e depende de uma bateria de exames laboratoriais (BARTHI et al., 2003; ELLIS, 2015). Além disso, alguns

fatores como o momento de coleta da amostra e o mesmo tipo de amostra são fundamentais para chegar ao diagnóstico definitivo da leptospirose.

Durante a fase aguda da doença é comum apresentar-se quadro de leptospiremia, permanecendo por 3 a 10 dias; portanto, nessa fase aguda é importante avaliar a presença de DNA leptospiral. Logo após essa fase inicia-se a produção de anticorpos, geralmente na segunda semana pós-infecção, permanecendo por algumas semanas (Figura 2) (PICARDEAU, 2013).

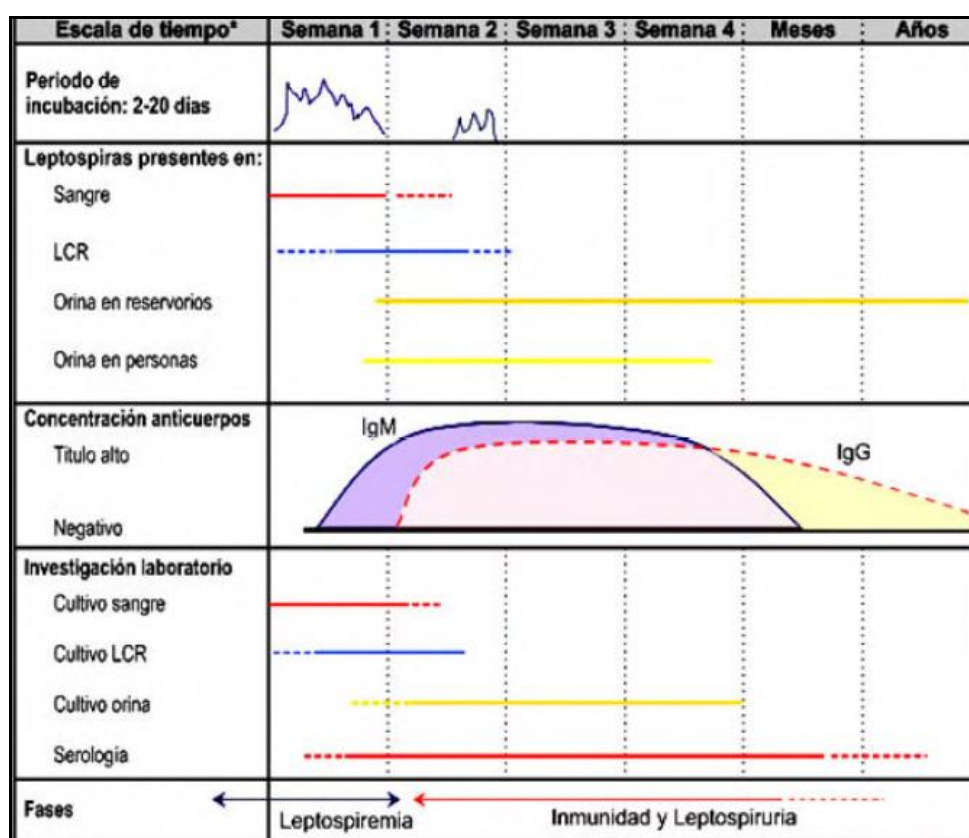


Figura 2. A leptospirose em suas fases clínicas em correlação com os momentos de coleta de amostra (Fonte: Céspedes, 2006)

2.6.1. Exame microscópico

As leptospirose podem ser visualizadas sob microscopia de campo escuro, a partir de amostras de sangue, urina ou líquido cefalorraquidiano, sendo que, o ideal para visualização seria aproximadamente 10^4 leptospirose/mL. Com isso, a busca de leptospirose pela microscopia de campo

escuro apresenta uma sensibilidade e especificidade baixas (LEVETT, 2004; AHMAD e SHAH, 2005). Além disto, a simples detecção de espiroquetas ao exame direto não permite o diagnóstico definitivo da doença, sendo pertinente a realização de outras técnicas diagnósticas complementares, como os testes sorológicos e moleculares.

2.6.2. Isolamento do agente bacteriano

O isolamento de leptospiros em meio de Fletcher não constitui um exame de rotina prático para o diagnóstico por diferentes motivos: o período de incubação prolongado (até três meses, com exames semanais ou a cada 15 dias), requerimento de amostras recém-coletadas de animais que não tenham sido submetidos à tratamento, perigo de alta contaminação da cultura e baixa especificidade das culturas.

O meio mais usado para a cultura é o meio semi-sólido de Fletcher enriquecido com soro de coelho. Neste meio pode-se observar o crescimento das leptospiros macroscopicamente expressado na formação de um halo ou zona de opalescência, denominada de zona ou anel de Dinger (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

2.6.3. Exames sorológicos

A grande maioria dos casos de leptospirose são diagnosticados mediante sorologia. Os anticorpos IgM são detectados no sangue aos 5 – 7 dias após a aparição dos sinais clínicos (LEVETT, 2004). O teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) é o teste considerado como “padrão ouro” para o diagnóstico de leptospirose. Esta técnica tem a vantagem de ser a única específica para sorogrupos de *Leptospira* spp.; portanto, tem grande valor nos estudos epidemiológicos. Dentre as desvantagens destaca-se que não discrimina entre os anticorpos IgM e IgG, requer de muito investimento econômico para manter a bateria de leptospiros vivas (usadas como antígeno) e para a leitura dos resultados requer-se de pessoal qualificado e com muita experiência na área (AHMAD e SHAH, 2005; OIE, 2013).

O objetivo da SAM baseia-se em determinar o título máximo no qual 50% das leptospiros (antígenos vivos) no campo microscópico encontram-se aglutinadas. Estas aglutinações são diretamente proporcionais à quantidade de anticorpos anti-*Leptospira* na amostra avaliada. O ponto de corte, título a partir do qual uma amostra considera-se positiva, depende de diversos fatores: espécie animal, sorovar prevalente na região, presença de co-aglutinações, vacinações, entre outros; usualmente é aceito um título mínimo de 400 acompanhado de sinais clínicos para confirmar o diagnóstico. Exames pareados (duas amostras com espaço de 15 dias entre elas) também são realizados para confirmar o diagnóstico e, nesse caso, considera-se a quadruplicação do título (GORIS e HARTSKEERL, 2013; OIE, 2013).

Na atualidade tem sido estudada a importância do conhecimento dos sorovares prevalentes na região, com o intuito de utilizá-los na rotina diagnóstica do dia-a-dia. A importância disto seria o aumento da sensibilidade da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), aumentando a capacidade do teste de encontrar animais que sejam verdadeiramente reagentes ao teste sorológico (PINTO et al, 2015).

Outro teste sorológico encontrado no mercado é o ELISA. Este teste apresenta alta sensibilidade, mas não tem a especificidade do sorogrupo que proporciona a SAM; porém são usados como primeira linha no diagnóstico da leptospirose humana em muitos países da América Latina (MUSSO e LA SCOLA, 2013).

2.6.4. Exames moleculares

Existem diferentes protocolos de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) usados na detecção de DNA leptospiral. Com o decorrer dos anos tem se descrito diferentes protocolos usando *primers* gerais, para leptospiros patogênicas e não patogênicas, e *primers* específicos para leptospiros patogênicas; contudo, dois protocolos tem sido os mais usados nos campos clínico e acadêmicos (LEVETT, 2004; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

O protocolo desenvolvido por Merien et al., (1992) descreveu a amplificação de um fragmento de 331 pb, utilizando-se os *primers* LEP1/LEP2, os quais codificam tanto para leptospiros patogênicas como para as não patogênicas. O outro protocolo desenvolvido por Brown et al., (1995), utilizou os primers G1/G2, os quais não amplificam os sorovares da espécie *L. kirschneri*. Apesar das limitações de ambos os protocolos, estes continuam sendo os de eleição no diagnóstico e na pesquisa.

As principais amostras das quais tem se amplificado DNA leptospiral são: soro, urina, humor aquoso, líquido cefalorraquidiano e tecidos como rim e fígado (LEVETT, 2004). A PCR em tempo real (qPCR) é mais rápida e menos sensível aos contaminantes do que a PCR convencional. Existe um protocolo de PCR em tempo real utilizando SYBR Green como fluorocromo, tendo o mesmo validação para amostras de urina e soro (LEVETT et al., 2005).

Apesar da alta sensibilidade das técnicas moleculares na detecção de *Leptospira* spp., ainda se tem como limitante o fato de que estas técnicas não são úteis em estudos epidemiológicos, por exemplo, para se determinar origens de surtos de leptospirose, o qual é um ponto a favor da técnica sorológica de SAM (WHO, 2003; GORIS e HARTSKEERL, 2013).

2.7. Tratamento

Os antibióticos são de grande utilidade no tratamento da doença. Este tratamento deve iniciar-se tão rápido quanto seja possível. (LEVETT e HAAKE, 2010). É importante realizar o tratamento completo e com as doses adequadas para cada espécie, devido a que o paciente pode demonstrar uma recuperação completa, mas as leptospiros ainda podem estar permanecendo nos rins, deixando os indivíduos infectados em condição de carreadores e disseminadores (SARKAR et al., 2012; MIRAGLIA et al., 2013).

Nos casos severos de leptospirose animal recomenda-se altas doses de penicilina intravenosa (até 4 vezes por dia). Nos casos menos graves, antibióticos orais como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina ou eritromicina

podem ser prescritos. As cefalosporinas de terceira geração e as quinolonas também se reportaram efetivas no tratamento e para eliminação das leptospiros dos túbulos renais proximais (WHO, 2003). Nos bovinos se tem reportado o uso da estreptomicina, especialmente para a eliminação de leptospiros dos túbulos renais proximais (GIRIO et al., 2005).

2.8. Prevenção

Na saúde animal, uma das melhores estratégias de prevenção é a imunização. Na atualidade conta-se com vacinas efetivas tanto para os animais de produção como para os animais domésticos. Para os animais de produção os principais sorovares incluídos na vacina são *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, *Leptospira interrogans* sorovar Grippotyphosa, *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo, *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae (HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011).

Devido ao caráter geralmente crônico da doença em animais de produção, estes animais representam potenciais disseminadores da enfermidade; por isso, recomenda-se o trabalho conjunto da imunização, tratamento de animais e adequadas técnicas de manejo – medidas de controle de roedores, vestimenta protetora para os trabalhadores (uso adequado dos equipamentos de proteção individual –EPIs) e adequado sistema sanitário (WHO, 2003; ZAVITSANOU e BABATSIKOU, 2008; LEVETT e HAAKE, 2010).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

- Avaliar o estado sanitário de bovinos de fazendas de cria e de vacas receptoras de embrião, em relação ao diagnóstico de leptospirose, na região de Bauru – SP.

3.2 Específicos

- Determinar a soroprevalência da leptospirose em bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP, utilizando-se a técnica de Soroaglutinação Microscópica – SAM;
- Detectar *Leptospira* spp. pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir de amostras de sangue de bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião e de sêmen de touros de fazendas de cria;
- Isolar *Leptospira* spp. mediante cultura em meio de Fletcher a partir de sangue de vacas e touros e sêmen dos últimos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

As culturas em meios de Fletcher, as análises sorológicas e a pesquisa molecular foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Pólo Centro-Oeste – Bauru – SP. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, com protocolo N° 187/2014- CEUA (Anexo 1).

4.1. Cálculo de tamanho amostral

Para calcular o tamanho da amostra foi utilizado o programa Epi Info^{TD} (<http://www.openepi.com>). Nesta versão online do software foi calculado o tamanho amostral utilizando-se o intervalo de confiança de 95% para uma população infinita e baseado no dado de soroprevalência encontrado por Langoni et al., (2000) na região de Bauru de 58.7%. O resultado foi de no mínimo 373 amostras.

Foram avaliados bovinos procedentes de centrais de receptoras de embrião e de fazendas de cria, em estação de monta. Foram escolhidas cinco propriedades da região de Bauru, com histórico de problemas de fertilidade (abortos, repetição de cio, infertilidade, entre outros), para realizar a amostragem: três (03) centrais de receptoras de embrião e duas (02) fazendas de cria (gado de corte). Nas fazendas de cria os animais não eram vacinados contra leptospirose, e nas fazendas de vacas receptoras de embrião os animais eram vacinados contra leptospirose anualmente, antes do começo das implantações dos embriões; no último caso as amostras de sangue foram colhidas antes da vacinação. Nas fazendas de cria foram amostrados tanto bovinos machos, usados como touros de repasse, como fêmeas. No quadro 1, apresenta-se o número de animais amostrados de cada propriedade.

Quadro 1. Número de animais procedentes de Centrais de receptoras e fazendas de cria, da região de Bauru, amostrados para diagnóstico de leptospirose. Botucatu, SP, 2016.

Propriedades	Animais
Central receptoras 1	33 vacas
Central receptoras 2	36 vacas
Central receptoras 3	35 vacas
Fazenda de cria 1	155 vacas 12 touros
Fazenda de cria 2	104 vacas 25 touros
Total	400 animais

4.2. Coleta de amostras

4.2.1. Sangue

Foi coletado sangue dos animais em dois tubos de vidro estéreis de aproximadamente 10 mL, sendo um tubo com anticoagulante (EDTA ou Citrato de Sódio) para o cultivo e a prova de PCR; e outro tubo sem anticoagulante para a prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM). Os tubos foram devidamente identificados para cada animal e acondicionados sob temperatura de refrigeração em caixa isotérmica com gelo reciclável até a chegada ao laboratório.

No laboratório, cada amostra obtida foi acondicionada em microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados e mantidos sob congelamento a -20 °C até o momento de realização da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e extração de DNA para PCR.

4.2.2. Sêmen

Foram coletados de 1 a 2 mL de sêmen dos touros de repasse das fazendas de cria mediante o método de eletro ejaculação. Cada amostra obtida foi acondicionada em microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados, sendo

que 0,5 mL de cada amostra foi utilizada para cultura em meio Fletcher e o restante mantido sob congelamento a -20 °C e 0.1 mL para a extração de DNA para posterior teste de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

4.3. Exames diagnósticos

4.3.1. Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi realizada segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995). Como antígenos para a prova foram utilizados culturas vivas de *Leptospira* spp. mantidas em estufa de 28°C a 30°C, faixa de temperatura ideal para o seu desenvolvimento, com quatro a 14 dias de crescimento, e que não apresentaram contaminantes e nem auto-aglutinações.

Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:50 em solução salina tamponada (SST) pH 7,6 como ponto de corte positivo e testada para uma bateria de 31 sorovares de *Leptospira* spp. (quadro 2), considerando-se como positiva aquela que apresentava 50% ou mais de aglutinações em relação ao controle negativo (BRASIL, 1995).

Quadro 2. Bateria de sorovares de *Leptospira* spp. incluídos no estudo.
Botucatu, SP, 2016.

ESPÉCIE	SOROGRUPO	SOROVAR	CEPA
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Butembo	Butembo
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. weilli</i>	Celledoni	Whitcombi	Whitcombi
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3552 C
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Sentot	Sentot
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46/RA 94
<i>L. noguchi</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	LT 821
<i>L. borgpetersenii</i>	Shermani	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH 11
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	Bov G.
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Hardjobovis
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	HardjoCTG	HardjoCTG
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Mini	Hardjominis
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	HardjoPrajitno	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Nupez	NUP-1

Dividiu-se o teste em duas etapas: triagem e titulação. Todas as amostras foram submetidas à triagem, e as reagentes passavam à segunda etapa de titulação.

Triagem

1. O soro foi diluído em 1:50 (solução A), 0.1 mL da amostra em 4.9 mL de solução salina tamponada (SST) pH 7.6.
2. Em uma microplaca, previamente marcada, pipetaram-se 50 uL da solução A formando uma fileira. O número de poços preenchidos dependeu do número de sorovares testados na placa. A ação foi repetida para cada orifício dos controles negativos, mas com SST em vez de soro problema.
3. Acrescentaram-se nos respectivos orifícios, inclusive controles, 50 uL das correspondentes suspensões antigênicas, passando a diluição final em cada orifício para 1:100.
4. Levou-se a microplaca a incubação em estufa de 28°C a 30°C por duas horas.

Titulação

1. A partir da diluição 1:50 utilizada na prova da triagem, preparou-se mais seis diluições do soro problema (1:100 até 1:3200).
2. Preparou-se em uma microplaca com fileiras de seis poços e cada poço correspondeu a uma diluição.
3. À parte foi preparado um controle para cada antígeno (sorovar) utilizado.
4. Colocaram-se 100 uL da solução A no primeiro poço de reação de cada sorovar testado. Nos demais poços colocaram-se 50 uL de SST pH 7.6.
5. Para a obtenção das diluições, se procedeu da seguinte forma: Pipetaram-se 50 uL da primeira diluição para o próximo poço (que continha 50 uL da SST), agindo assim sucessivamente, homogeneizando e desprezando 50 uL de cada última diluição. No final, todos os poços apresentaram 50 uL de suspensão (solução A + SST), correspondentes as diluições 1:50 até 1:1600 em cada fileira.

6. Pipetou-se 50 uL do antígeno (sorovar) correspondente a cada poço da respectiva fileira ao controle. Nessa etapa, as diluições passaram a ser de 1:100 até 1:3200.
7. Incubou-se a microplaca conforme descrito para a parte da triagem.
8. À leitura sob microscopia de campo escuro, considerou-se como título aglutinante a maior diluição do soro capaz de aglutinar no mínimo 50% de leptospiros por campo, em relação ao controle.

4.3.2. Cultura em meio de Fletcher

As amostras de sangue e sêmen foram processadas em capela de fluxo laminar, devidamente esterilizado com álcool a 70% e sob ação de luz ultravioleta durante 30 minutos.

As amostras foram diluídas na razão de 10^{-1} a 10^{-3} , segundo PASSOS et al. (1998) em solução diluente composta por solução salina tamponada estéril pH 7.6, Furacin (2mg/mL) e Neomicina (50mg/mL). O procedimento consistiu em inocular 0.5 mL da amostra (sangue ou sêmen) no tubo com solução diluente, formando a primeira diluição 10^{-1} , homogeneizou-se e transferiu-se 0,5 mL desse primeiro tubo para o segundo, e repetiu-se a ação até uma terceira diluição, 10^{-3} . O último passo foi inocular 0,5 mL de cada diluição em tubos com meio semi-sólido de Fletcher e adicionar 0,1 mL de 5-fluorouracil na concentração de 250 ug/mL, para evitar o desenvolvimento de contaminantes. As culturas foram incubadas a 28-30 °C por 16 semanas, sendo examinadas cada 15 dias.

Armazenou-se 1 mL de cada diluição, resultando em 3 mL de cada amostra, em microtubos livres de DNases e RNases a -20 °C até o processamento de extração de DNA.

4.3.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.3.3.1. Preparo das amostras para a extração do DNA

As alíquotas de sangue e sêmen, bem como as culturas dos mesmos, foram armazenadas em microtubos sob temperatura de -20 °C. Para a

extração de DNA destas amostras, as mesmas foram descongeladas em cooler para microtubos antes de começar com os protocolos.

4.3.3.2. Extração e purificação do DNA

A extração de DNA a partir do sangue foi realizada utilizando o kit Illustra BloodTM genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare^R) (anexo 2) e a extração do DNA a partir de sêmen com o reagente DNAzol^R (Life Technologies^R) (anexo 3), conforme recomendações do fabricante. A extração de DNA a partir das culturas de sangue e sêmen em meio semi-sólido de Fletcher foi realizada com o kit Illustra BloodTM genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare^R).

4.3.3.3. Amplificação do DNA

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

LEP 1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3')

LEP 2 (5' TTCCCCCATTGAGCAAGATT 3')

A amplificação do DNA foi realizada segundo a adaptação descrita por MERIEN et al. (1992). As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL com volumes totais de 25 uL, sendo 2,5 uL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 uL de solução de dNTP (0,2 mM), 0,5 uL de Taq Platinum DNA (1U) (Invitrogen), 0,5 uL de cada iniciador ou primer (10 pM), 17,75 uL de água ultrapura e 2 uL de DNA da amostra obtida no final da extração.

A reação foi executada em termociclador Mastercycler Pro gradiente (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.

4.3.3.4. Eletroforese

A visualização dos produtos amplificados foi realizada pela técnica de eletroforese. Para tanto foi preparado um gel de agarose a 1,5% acrescentado com 1 uL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Life Technologies). Foram utilizados 15 uL do produto de PCR e como marcadores de peso molecular 5 uL de 100 pb ladder (Invitrogen). Para todas as amostras foram acrescentados 2 uL de uma solução de Blue Juice Gel Loading (Life Technologies). O gel foi submetido a corrida eletroforética em uma cuba horizontal HE33 (Amersham Biosciences) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09mL de ácido bórico e 0,001M de EDTA) e a voltagem de 80V por 50 minutos, 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 Major Science™ foi documentada utilizando-se o software Vision Works LS.

4.3.3.5. Controles

Para cada sequência de extração e purificação, foram utilizados controles positivos e negativos para a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Para isto foram preparadas suspensões de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni na concentração de $2,0 \times 10^4$ leptospiplas/mL, como controle positivo. Para o controle negativo foi utilizada água ultrapura.

4.4. Análise estatística

As análises estatísticas descritivas foram calculadas usando o software Excel (Microsoft). O Software SAS 9.4 foi usado para avaliar a associação entre os testes diagnósticos utilizados e para calcular o valor estatístico Kappa, o último foi utilizado principalmente para avaliar a concordância entre o SAM e a PCR nas amostras de sangue.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento

Das 400 amostras avaliadas, 100% foram negativas à visualização sob microscópio de campo escuro.

5.2. Exame sorológico

Dos 400 animais avaliados, 83% (331/400) foram reagentes à prova de SAM para pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp. avaliado. Pode-se verificar uma porcentagem consideravelmente maior de animais soropositivos (Figura 3).

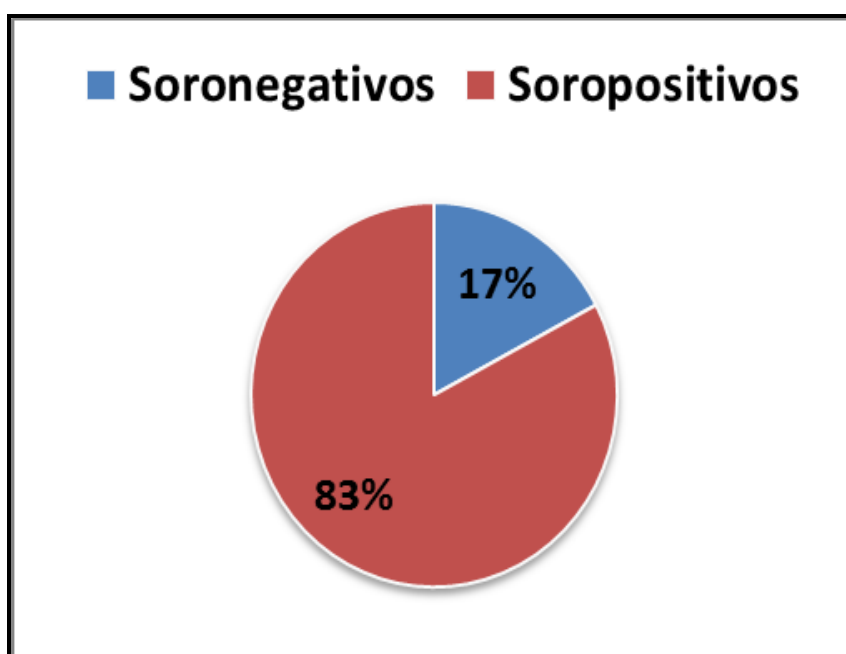


Figura 3. Distribuição dos resultados da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), em bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

Observou-se soropositividade para 26 dos 31 sorovares avaliados no teste sorológico de SAM, tendo-se verificado o sorovar Hardjoprajitno como o mais reagente (Figura 4). Os sorovares não reagentes foram Castellonis, Bataviae, Whitcombi, Javanica e Andamana.

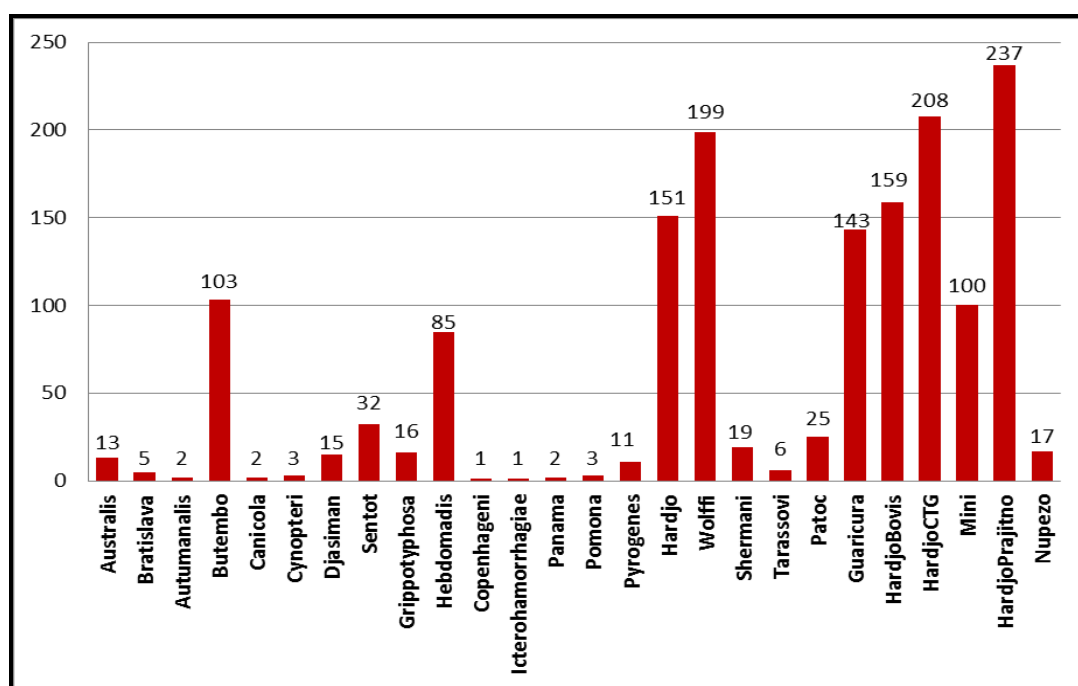


Figura 4. Sorovares reagentes à técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

As frequências observadas para cada sorovar nos bovinos reagentes (331/400) encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Soropositividade dos bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP, por sorovar, à prova de SAM. Botucatu, SP, 2016.

SOROVAR	BOVINOS REAGENTES	FREQUÊNCIA
Australis	13	3,9%
Bratislava	5	1,5%
Autumnalis	2	0,6%
Butembo	103	31,1%
Canicola	2	0,6%
Cynopteri	3	0,9%
Djasiman	15	4,5%
Sentot	32	9,7%
Grippotyphosa	16	4,8%
Hebdomadis	85	25,7%
Copenhageni	1	0,3%
Icterohaemorrhagiae	1	0,3%
Panama	2	0,6%
Pomona	3	0,9%
Pyrogenes	11	3,3%
Hardjo	151	45,6%
Wolffi	199	60,1%
Shermani	19	5,7%
Tarassovi	6	1,8%
Patoc	25	7,6%
Guaricura	143	43,2%
HardjoBovis	159	48%
HardjoCTG	208	62,8%
Mini	100	30,2%
HardjoPrajitno	237	71,6%
Nupez	17	5,1%

Em relação à titulação obtida frente aos animais reagentes à prova de Soroaglutinação Microscópica, a maioria dos animais soropositivos apresentaram títulos máximos de 100 e 200, títulos geralmente denominados

de exposição. Os maiores títulos aglutinantes, 3200 e 6400, apresentaram-se nos sorovares do sorogrupo Sejroe (Tabela 2).

Tabela 2. Titulação de bovinos reagentes à prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), em fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

Sorovar	Título aglutinante							Total
	100	200	400	800	1600	3200	6400	
Australis	10	3	-	-	-	-	-	13
Bratislava	3	1	1	-	-	-	-	5
Autumnalis	1	1	-	-	-	-	-	2
Butembo	81	21	-	-	-	-	-	103
Canicola	1	1	-	-	-	-	-	2
Cynopteri	1	2	-	-	-	-	-	3
Djasiman	14	1	-	-	-	-	-	15
Sentot	24	7	1	-	-	-	-	32
Grippotyphosa	8	5	2	1	-	-	-	16
Hebdomadis	42	26	13	3	-	-	-	86
Copenhageni	1	-	-	-	-	-	-	1
Icterohaemorrhagiae	-	1	-	-	-	-	-	1
Panama	2	-	-	-	-	-	-	2
Pomona	1	1	1	-	-	-	-	3
Pyrogenes	5	6	-	-	-	-	-	11
Hardjo	70	43	27	9	2	-	-	151
Wolffi	49	52	38	30	19	6	5	199
Shermani	16	3	-	-	-	-	-	19
Tarassovi	3	3	-	-	-	-	-	6
Patoc	22	3	-	-	-	-	-	25
Guaricura	55	44	26	12	4	2	-	143
HardjoBovis	57	52	32	10	3	5	-	159
HardjoCTG	46	50	54	31	20	5	2	208
Mini	41	34	12	12	2	-	-	101
HardjoPrajitno	29	60	57	34	35	18	4	237
Nupezoz	9	4	2	2	-	-	-	17

Os dados de soropositividade variaram também segundo a fazenda avaliada (Tabela 3).

Tabela 3. Soroaglutinação Microscópica (SAM), em fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP, segundo as fazendas avaliadas. Botucatu, SP, 2016.

Fazenda	Reagente	Animais	Frequência x fazenda	Frequência total
Fazenda de cria 1	Sim	114	88,4 %	28,5 %
	Não	15	11,6 %	3,8 %
Total		129	100 %	32,3 %
Fazenda de cria 2	Sim	131	78,4 %	32,8 %
	Não	36	21,6 %	9 %
Total		167	100 %	41,8 %
Central Receptoras 1	Sim	29	87,9 %	7,3 %
	Não	4	12,1 %	1 %
Total		33	100 %	8,3 %
Central Receptoras 2	Sim	29	80,6 %	7,2 %
	Não	7	19,4 %	1,8 %
Total		36	100 %	9 %
Central Receptoras 3	Sim	28	80 %	7 %
	Não	7	20 %	1,8 %
Total		35	100 %	8,8 %
Total geral		400		100 %

A análise da soropositividade dos animais segundo o sexo encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Soroaglutinação Microscópica (SAM), em fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP, segundo o sexo. Botucatu, SP, 2016.

Sexo	Reagente	Animais	Frequência por sexo	Frequência total
Bovinos machos	Sim	33	89,2 %	8,3 %
	Não	4	10,8 %	1 %
	Total	37	100 %	9,3 %
Bovinos fêmeas	Sim	298	82,1 %	74,5 %
	Não	65	17,9 %	16,3 %
	Total	363	100 %	90,8 %
Total geral		400		100 %

5.3. Exame molecular

Realizou-se a prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de tipo convencional, nas amostras de sangue dos 400 animais amostrados, assim como dos 400 pool de culturas em meio Fletcher que tinham sido negativas, para confirmação dos resultados. Além disso, realizou-se a prova nas amostras de sêmen obtidas dos touros das fazendas de cria. O protocolo utilizado foi o de Merien et al. (1992), com algumas modificações.

Os resultados da PCR das culturas negativas ao crescimento em meio Fletcher sob microscopia de campo escuro, estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) das culturas de sangue negativas ao crescimento em meio Fletcher sob microscópio de campo escuro. Botucatu, SP, 2016.

PCR	Animais	Frequência
Positivas	4	1 %
Negativas	396	99 %
Total	400	100 %

Os resultados da PCR das 400 amostras de sangue estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

PCR	Animais	Frequência
Positivas	3	0,7 %
Negativas	397	99,3 %
Total	400	100 %

Os resultados da PCR das amostras de sêmen estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) do sêmen dos touros de fazendas de cria na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

PCR	Animais	Frequência
Positivas	3	8.1 %
Negativas	34	91.9 %
Total	37	100 %

Os resultados da PCR das culturas de sêmen negativas ao crescimento em meio Fletcher sob microscopia de campo escuro estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) das culturas de sêmen dos touros de fazendas de cria na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

PCR	Animais	Frequência
Positivas	5	13,5 %
Negativas	32	86,5 %
Total	37	100 %

5.4. Comparação dos testes diagnósticos

Realizaram-se três testes diagnósticos: Cultura, Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Devido ao fato de que todas as amostras foram negativas à Cultura em meio Fletcher, não foi possível realizar-se a comparação entre este teste com os outros dois utilizados.

A comparação entre os resultados gerais da SAM, teste padrão, e da PCR, foi realizada mediante o teste exato de Fisher. Os resultados descrevem-se na tabela 9.

Tabela 9. Teste exato de Fisher entre a SAM e a PCR dos bovinos de fazendas de cria e vacas de centrais receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

		SAM		Total
		Positivo	Negativo	
PCR SANGUE	Positivo	0	3	3
	Negativo	331	66	397
Total		331	69	400
*Valor p = 0.0049 (significativo)				
*Coeficiente K = -0.0151 (discordante)				

A comparação entre os resultados da PCR das culturas do sangue e do sangue direto foi feita mediante análise com o Teste exato de Fisher, tomando como teste padrão a PCR direta do sangue. Os resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Teste exato de Fisher entre a PCR do sangue e das culturas do sangue, dos bovinos de fazendas de cria e de vacas de centrais receptoras de embrião na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

		PCR Sangue		Total
		Positivo	Negativo	
PCR Culturas	Positivo	1	3	4
	Negativo	2	394	396
Total		3	397	400
*Valor p = 0.0298 (significativo)				
*Coeficiente K = 0.2795 (Concordância considerável)				

A comparação entre os resultados da PCR das culturas do sêmen e do sêmen foi feita também mediante análise no Teste exato de Fisher, tomando como padrão a PCR do sêmen. Os resultados se encontram na tabela 11.

Tabela 11. Teste exato de Fisher entre a PCR das culturas de sêmen e do sêmen dos bovinos de fazendas de cria na região de Bauru – SP. Botucatu, SP, 2016.

		PCR Sêmen		Total
		Positivo	Negativo	
PCR Culturas sêmen	Positivo	3	2	5
	Negativo	0	32	32
Total		3	34	37
*Valor p = 0.0013 (significativo)				
*Coeficiente K = 0.7218 (Concordância substancial)				



Figura 5. Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Resultados da amplificação dos genes *rrs* (16S) de 13 amostras das culturas de sêmen dos touros de fazendas de cria na região de Bauru – SP. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 3 e 4. Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Copenhageni. Controle negativo: água mili Q.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O objetivo geral do trabalho consistiu em avaliar o estado sanitário dos bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião, quanto ao diagnóstico de leptospirose, na região de Bauru – SP. Para tanto, procedeu-se ao isolamento de *Leptospira* spp. de amostras sanguíneas dos bovinos reprodutores e de sêmen dos touros usados para repasse nas fazendas de cria; verificação a soroprevalência de *Leptospira* spp. nos bovinos reprodutores da região de Bauru, mediante o teste “padrão ouro” SAM, e a detecção da presença de DNA de *Leptospira* spp. de amostras sanguíneas dos bovinos, culturas em meio Fletcher e sêmen dos bovinos reprodutores das fazendas amostradas.

Não foi possível o isolamento de *Leptospira* spp. de nenhuma cultura realizada (sangue e sêmen). Este resultado pode ser atribuído a varios motivos: a literatura indica que, para visualizar formas espiroquetídeas, estas devem apresentar-se em uma concentração de 10^4 leptospiros/campo; isto sugere que uma pequena quantidade de bactérias não permitam ser visualizadas com facilidade na cultura (ADLER e LA PENA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU, 2013); além disso, apesar de todos os procedimentos de cultura terem sido realizados de maneira estéril, há um grande risco de contaminação das culturas no momento da coleta, o que foi observado no momento de procedimento de coleta do sêmen, em que não houve a possibilidade de se coletar o material de maneira totalmente estéril, o que levou a contaminação de algumas culturas, apesar de todos os cuidados necessários durante os procedimentos de cultivo. Outro fator a ser considerado e de extrema importância é que provavelmente os animais avaliados não se encontravam na fase leptospirêmica da doença e, portanto, as culturas de amostras de sangue foram todas negativas.

Embora haja um grande número de estudos sorológicos em todo o mundo, o número de isolamentos é escasso, aliado ao fato de que a técnica de isolamento é um procedimento muito delicado, com alto risco contaminação e que requer um processamento rápido; portanto, tendo em vista todas estas

dificuldades, há poucos trabalhos para poder comparar a sorologia com dados bacteriológicos, principalmente nos países em desenvolvimento (LILENBAUM e MARTINS, 2014).

A prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) é uma técnica sorológica que utiliza antígenos vivos de *Leptospira* spp. em amostras de soro. Caso a amostra seja reagente a determinado antígeno, visualizam-se aglutinações (antígeno-anticorpo) na microscopia de campo escuro. Este método diagnóstico apresenta a vantagem de se determinar o sorogrupo infectante e quantificar o título aglutinante.

No presente estudo avaliaram-se 400 bovinos reprodutores mediante esta técnica diagnóstica, para determinar a soroprevalência de leptospirose bovina nessa região. Do total de bovinos avaliados, 83% (331/400) foram reagentes a pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp., e o ponto de corte foi determinado em 1/100 segundo OIE, 2013. Dentre os animais reagentes (331), observou-se que os sorovares mais frequentes foram os pertencentes ao sorogrupo Sejroe (Hardjoprajitno, HardjoCTG, Wolffi, Hardjobovis e Guaricura). Com relação à titulação, a qual possibilita verificar-se a severidade da infecção ou da exposição ao agente bacteriano, observou-se que a grande maioria dos títulos aglutinantes mais elevados (3200 e 6400) foram igualmente os sorovares do sorogrupo Sejroe. Esses resultados alertam para a necessidade do monitoramento da leptospirose nas propriedades avaliadas.

No Brasil, verifica-se que a leptospirose é uma das doenças reprodutivas com maior importância nos animais de produção, já que ocasiona grandes prejuízos econômicos nas fazendas onde apresenta-se a infecção. A magnitude desta importância se vê refletida nos estudos de soroprevalência descritos nas cinco regiões brasileiras (quadro 3).

Quadro 3. Principais estudos de soroprevalência de leptospirose bovina no Brasil.

Região	Estado	Prevalência	Animais	Sorovares mais prevalentes	Autores
Norte	Rondônia	52,86%	2109 vacas	Hardjo, Wolffi, Shermani e Patoc.	Aguiar et al., 2006
	Maranhão	35,94%	4832 vacas	Hardjo e Wolffi.	Silva et al., 2012
Nordeste	Piauí	52,9%	1975 vacas	Hardjo e Wolffi	Mineiro et al., 2007
	Bahía	45,42%	10 823	Hardjo	Oliveira et al., 2009
Centro-Oeste	Goiás	74,28%	140 touros	Wolffi e Hardjo	De Campos et al., 2006
	Mato Grosso do Sul	98,8%	1801 vacas	Hardjo e Wolffi	Figuereido et al., 2009
Sul	Santa Catarina	100%	13 bovinos	Butembo	Saldanha et al., 2007
	Santa Catarina	65,53%	3945 vacas	Hardjo, Wolffi e Butembo.	Tonin et al., 2010
Sudeste	Rio de Janeiro	14%	120 vacas	Tarassovi e Hardjo	Folly et al., 2013
	São Paulo	45,8%	2761 bovinos	Wolffi e Hardjo	Langoni et al., 2000
	São Paulo	32,85%	140 bovinos	Hardjo e Castellonis	Langoni et al., 2007
	São Paulo	49,4%	8216 vacas	Hardjo e Wolffi	Castro et al., 2008

Pode ser observado que as prevalências encontradas nos estudos relatados são variáveis entre elas, mas de forma geral pode se observar que a prevalência da leptospirose é maior do que 50%, fato preocupante considerando a importância da doença. No presente estudo a prevalência foi de 83%, considerada elevada, e este valor pode ser justificado devido às condições climáticas tropicais mais exacerbadas na região de Bauru, o que pode favorecer à disseminação da doença nos rebanhos.

Podemos ressaltar que no presente estudo, determinou-se 31,1% (103/400) de bovinos soropositivos ao sorovar Butembo, porcentagem significativa, considerando-se que não se trata de um sorovar comum na espécie bovina. Tal sorovar é frequente em animais silvestres (ULLMANN et al. 2012; PAIXÃO et al., 2013), e, tendo em vista que estes animais encontram-se muitas vezes em proximidade com bovinos, estes encontram-se expostos à contaminação de água e pastagens com a urina destes animais.

Portanto, tendo em vista os resultados apresentados e, confrontando-se com os trabalhos publicados, pode-se verificar que os sorovares Hardjo e Wolffi são os sorovares mais frequentemente encontrados em bovinos em diferentes estados da federação do Brasil.

A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) vem sendo utilizada no campo de diagnóstico de doenças no geral há alguns anos. No caso da leptospirose, tem se descrito diferentes tipos de protocolos de PCR, tanto convencionais quanto em tempo real, os quais amplificam genes de diferentes tipos: 16S, gyrB, SecY, lipoproteínas (lipL 32), lig A e Lig B e outros (PICARDEAU, 2013). O protocolo utilizado para este trabalho foi o de Merien et al. (1992), o qual está baseado na amplificação do gene rrs (16S) de 331 pb, presente tanto em leptospirosas patogênicas como não patogênicas. Este protocolo é um dos protocolos de PCR validados e mais utilizados na atualidade (PICARDEAU, 2013).

Os resultados da PCR das amostras de sangue dos 400 animais neste estudo, indicaram que somente três animais foram positivos nesse teste, detectando a presença de DNA de *Leptospira* spp nestas amostras. Destes 0,7% de animais positivos (3/400), todos foram negativos ao teste SAM e tratavam-se de fêmeas bovinas que pertenciam às fazendas de cria. Este resultado pode indicar que estes animais positivos à PCR estivessem na primeira fase da leptospirose: a fase aguda. Esta fase caracteriza-se pela leptospiremia, que facilita a detecção de DNA leptospiral a partir de sangue.

No caso das análises de PCR para confirmação das culturas negativas em meio Fletcher, observaram-se que das 400 culturas negativas à formas espiroquetídeas sob microscopia de campo escuro, quatro foram positivas à PCR. Dessas amostras duas eram de touros e duas de vacas e as quatro pertenciam ao gado das fazendas de cria. Este resultado pode ser explicado pela baixa especificidade da técnica de cultura de *Leptospira* spp., já que para visualizar formas espiroquetídeas estas devem apresentar-se em uma concentração mínima de 10^4 leptospiras/ml; em comparação com a concentração mínima de 10 leptospiras/mL à PCR (ADLER e LA PENA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU, 2013).

A grande maioria de trabalhos publicados referente aos testes moleculares para diagnóstico de leptospirose, com amostras de sangue, baseia-se em padronização e avaliação de novos protocolos de PCR ou surgimento de novas técnicas moleculares (AHMED et al., 2009; STODDARD et al., 2009; BACKSTEDT et al., 2015). Assim, poucos estudos como este avaliam uma combinação entre a sorologia e a parte molecular. Por exemplo, Waggoner et al. (2015) avaliaram se existia concordância entre o resultado sorológico e molecular com as mesmas amostras de soros humanos, encontrando-se um resultando discordante entre ambos testes. No presente trabalho, foi avaliada essa mesma relação e o resultado indicou que não houve concordância entre ambos os testes ($K = -0.0151$), ratificando que eles devem ser usados para etapas diferentes da doença, já que os animais positivos à PCR foram negativos no SAM, indicando que ainda pudessem se encontrar na

fase aguda da doença sem ter iniciado a produção de anticorpos aglutinantes, ou sendo estes ainda insuficientes para detecção.

Na comparação entre a PCR do sangue e a PCR das culturas negativas da mesma amostra, observou-se que dos três animais que foram positivos à PCR do sangue e dos quatro animais positivos à PCR confirmatória das culturas, apenas um animal foi positivo em ambos os testes. Os outros dois animais positivos à PCR do sangue e negativos à PCR da cultura poderiam ser justificados devido a possível presença de inibidores da PCR no meio da cultura ou devido a um crescimento insuficiente para a observação no meio de cultura. Por outro lado, os três animais que foram positivos à PCR das culturas e negativos às PCR do sangue poderiam ser justificados pela possível presença de inibidores da PCR no sangue, que tenham impossibilitado a amplificação adequada do DNA leptospiral nestas amostras (PICARDEAU, 2013).

Considerando a positividade dos animais, tanto molecular (fase aguda da leptospirose) quanto sorológica (fase crônica da doença ou caráter de reservatório), ainda que em diferentes frequências, podemos ratificar a notável presença da doença nas fazendas avaliadas. Nas fazendas de cria foram encontrados animais positivos para *Leptospira* spp. no sangue, indicando estarem na fase aguda da doença (leptospiremia), deduzindo que a bactéria pode estar sendo disseminada por secreções dos animais portadores (em muitos casos com títulos sorológicos elevados) nessas fazendas. Essa informação associada com a falta de medidas profiláticas (falta de programa de vacinação para leptospirose) confirma o risco que esses animais representam, não somente o prejuízo econômico na fazenda (tratamento e implantações de medidas profiláticas), como também o risco de saúde pública para os trabalhadores que lidam com esses bovinos na rotina diária.

No caso das amostras de sêmen, as análises determinaram que das 37 amostras, 3 (8,1%) foram positivas na PCR de sêmen direto, enquanto cinco (13,5%) das culturas (inicialmente negativas) foram positivas à PCR. As duas

amostras que foram positivas à PCR das culturas mas negativas à PCR direta do sêmen, poderiam ter sofrido alguma inibição na PCR, provavelmente como consequência do processo de extração. É conhecido que o sêmen apresenta muitos inibidores da PCR, e é provável que essa tenha sido a causa da falta de amplificação dessas duas amostras.

São poucos os trabalhos utilizando PCR em amostras de sêmen e fluidos vaginais de animais de grande porte, tendo eles como principal propósito demonstrar o potencial risco de transmissão sexual da doença (HEINEMANN et al., 1999; HEINEMANN et al., 2000; LILENBAUM et al., 2008; HAMOND et al., 2014). No presente trabalho, foi demonstrado que pelo menos três animais positivos ao teste de PCR do sêmen apresentam um risco nas fazendas avaliadas, na transmissão sexual da doença e a manutenção da mesma nos bovinos reprodutores; apresentando também um risco de saúde pública para os trabalhadores da fazenda pelo contato direto e indireto com estes animais e/ou com suas secreções.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Os resultados representam um alerta para o estado sanitário da leptospirose em bovinos de fazendas de cria e vacas receptoras de embrião na região de Bauru, já que os mesmos apresentaram-se reagentes a diferentes sorovares de leptospiros e alguns animais com títulos elevados para os principais sorovares de importância epidemiológica na leptospirose bovina, demonstrando exposição prévia ao agente;
- Ainda que não se tenha isolado leptospiros a partir das culturas de sangue e sêmen dos animais, os resultados sorológicos e moleculares alertam para a necessidade do monitoramento para leptospirose nestas propriedades;
- As provas moleculares de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. realizadas em amostras de sangue detectaram animais na fase aguda da doença;
- As provas moleculares de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. realizadas nas amostras de sêmen dos touros das fazendas de cria demonstram haver um risco importante de transmissão da doença mediante contato sexual, levando à permanência da doença entre os animais das fazendas avaliadas, bem como representando um risco ainda maior à saúde pública, com relação aos trabalhadores que lidam com os animais nestas fazendas.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA*

ABELA-RIDDER, B.; SIKKEMA, R.; HARTSKEERL, R.A. Estimating the burden of human leptospirosis. *International journal of antimicrobial agents*, v. 36, p. S5-S7, 2010.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Washington, EUA. 2003. p. 175-186.

ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Veterinary microbiology*, v. 172, n. 3, p. 353-358, 2014.

ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 387, p. 251-272, 2015.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.

AGUIAR, D.M.; GENNARI, S.M.; CAVALCANTE, G.T.; LABRUNA, M.B.; VASCONCELLOS, S.A.; RODRIGUES, A.A.R.; MORAES, Z.M.; CAMARGO, L.M.A. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em bovinos do município de Monte Negro, Amazônia ocidental. *Pes. Vet. Bras.*, v. 26, n. 2, p. 102-104, 2006.

AHMAD, S.N.; SHAH, S. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Journal of postgraduate medicine*, v. 51, n. 3, p.195, 2005.

AHMED, A.; ENGELBERTS, M.F.M; BOER, K.R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R.A. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. *Plos One*, v. 4, n. 9, e7093, 2009.

BACKSTEDT, B.T.; BUYUKTANIR, O.; LINDOW, J.; WUNDER, E.A.; REIS, M.G.; USMANI-BROWN, S.; LEDIZET, M.; KO, A.; PAL, U. Efficient Detection of Pathogenic Leptospire Usind 16S Ribosomal RNA. *Plos One*, v. 10, n. 6, e0128913, 2015.

BARUSELLI, P.S.; FILHO, M.F.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; VIEIRA, L.M.; MENDANHA, M.F.; BO, G.A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 4, n. 4, p. 134-141, 2012.

BERNARDI, F.D.C.; CTENAS, B.; DA SILVA, L.F.F.; NICODEMO, A.C.; SALDIVA, P.H.N.; DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T. Immune receptors and adhesion molecules in human pulmonary leptospirosis. *Human pathology*, v. 43, n.10, p. 1601-1610, 2012.

BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICARDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DÍAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M.. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BONDURANT, R.H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 21, n. 2, p. 383-408, 2005.

BRASIL. Manual de Leptospirose. 2da ed. Fundação Nacional de Saúde, Ministerio de Saúde. Brasília, 1995. 98p.

BROWN, P.D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D.G.; VAN DE KEMP, H.; HARTSKEERL, R.A.; EDWARDS, C.N.; EVERARD, C.O.R.; TERPSTRA, W.J.; LEVETT, P.N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of medical microbiology*, v. 43, n. 2, p. 110-114, 1995.

CAMPAGNOLO, E.R.; WARWICK, M.C.; MARX, H.L.; COWART, R.P.; DONNELL, H.D.; BAJANI, M.D.; BRAGG, S.L.; ESTEBAN, E.; ALT, D.P.; TAPPERO, J.W.; BOLIN, C.A.; ASHFORD, D.A. Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 216, n. 5, p. 676-682, 2000.

CASTRO, V.; AZEVEDO, C.C.; GOTTI, T.B.; BATISTA, C.S.A.; GENTILI, J.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; VASCONCELLOS, S.A.; GENOVEZ, M.V. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v. 75, n. 1, p. 3-11, 2008.

CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, n. 5, p. 760-768, 2009.

CÉSPEDES, M.; BALDA, L.; GONZÁLEZ, D.; TAPIA, R. Situación de la leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, v. 23, n. 1, p. 56-66, 2006.

CHARON, N.W.; GOLDSTEIN, S.F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annual Review of Genetics*, v. 36, n. 1, p. 47-73, 2002.

CHOY, H.A.; KELLEY, M.M.; CHEN, T.L.; MOLLER, A.K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infection and immunity*, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.

CORNEY, B.G.; SLACK, A.T.; SYMONDS, M.L.; DOHNT, M.F.; MCCLINTOCK, C.S.; MCGOWAN, M.M.; SMYTHE, L.D. *Leptospira weilii* serovar Topaz, a new member of the Tarassovi serogroup isolated from a bovine source in Queensland, Australia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 10, p. 2249-2252, 2008.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; ADLER B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. FEMS microbiology reviews, v. 28, n. 3, p. 291-318, 2004.

DAS NEVES PAIVA-CARDOSO, M.; ARENT, Z.; GILMORE, C.; HARTSKEERL, R.; ELLIS, W.A. Altodouro, a new *Leptospira* serovar of the Pomona serogroup isolated from rodents in northern Portugal. Infection, Genetics and Evolution, v. 13, p. 211-217, 2013.

DE CAMPOS, A.C.P.; FRENEAU, G.E.; JULIANO, R.S.; ACYPRESTE, C.S.; DIAS, F.C.; MARTINS, M.E. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em machos bovinos na microrregião de Goiânia. Ciência Animal Brasileira, v. 7, n. 4, p. 439-446. 2006.

DREYFUS, A.; WILSON, P.; COLLINS-EMERSON, J.; BENSCHOP, J.; MOORE, S.; HEUER, C. Risk factors for new infection with *Leptospira* in meat workers in New Zealand. Occup. Environ Med, v. 72, p. 219-225, 2015.

DUPOUEY, J.; FAUCHER, B.; EDOUARD, S.; RICHET, H.; KODJO, A.; DRANCOURT, M.; DAVOUST, B. Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, v. 37, n. 2, p. 77-83, 2014.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as cause of reproductive failure. Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice, v.10, n.3, p.463-478, 1994.

ELLIS, W.A. Animal leptospirosis. Cur Top Microbiol Immunol, v. 387, p. 99-137, 2015.

EVANGELISTA, K.V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future microbiology, v. 5, n. 9, p.1413-1425, 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. Medisci, Melbourne, 1999.

FIGUEREIDO, A.; PELLEGRIN, A.O.; GONCALVES, V.S.P.; FREITAS, E.B.; MONTEIRO, L.A.; OLIVEIRA, J.M.; OSORIO, A.L. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 5, p. 375-381, 2009.

FOLLY, M.M.; DA SILVA, L.G.; PEREIRA, M.M.; DE SOUZA, G.V.; DA SILVA, T.F. Anti-*Leptospira* agglutinins in farm workers, bovines and canines performed in the microregion of Itaperuna, Rio de Janeiro, Brazil. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, v. 6, n. 11, p. 406-417, 2013.

GIRIO, T.M.S.; MAGAJEVSKI, F.S.; GIRIO R.J.S.; MIASHYRO, S.; RODRIGUES, L.H.; SCARCELLI, E.P.; TOMA, S.B. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospirose em touros (*Bos taurus indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar Hardjo. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n. 2, p. 161-170, 2005.

GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE, C.F.; BURTH, P.; SILVA, A.R.; YOUNES-IBRAHIM, M.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; CASTRO-FARIA, M.V.. *Leptospira* and inflammation. *Mediators of inflammation*, v. 2012, p. 11, 2012.

GORIS, M.G.; HARTSKEERL, R.A. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Current protocols in microbiology*, v. 12, p. E-5, 2013.

GOUVEIA, E.L.; METCALFE, J.; CARVALHO, A.L.F.; AIRES, T.S.F.; VILLALOBOS-BISNETO, J.C.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.C.; SALGADO K.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhage Syndrome, Salvador, Brazil. *Emer. Infect. Dis.*, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008.

GUERRA, M.A. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals*, v. 41, n. 5, p. 295-297, 2013.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; BREMONT, S.; MEDEIROS, M.A.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Predominance of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava DNA in vaginal fluid of mares suggests sexual transmission of leptospirosis. *Animal Reproduction Science*, v. 151, p. 275-279, 2014.

HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical microbiology and infection*, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M.; GREGORI, F.; MORAES, Z.M.; VASCONCELLOS, S.A.; RICHTZENHAIM, L.J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology*, v. 73, p. 261-267, 2000.

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

HERRMANN, G.P.; RODRIGUES, R.O.; MACHADO, G.; LAGE, A.; MOREIRA, E.; LEITE, R. Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Ci. Anim. Bras, Goiania*, v. 13, n. 1, p. 131-138, 2012.

HOOKEY, J.V.; BRYDEN, J.Y.; GATEHOUSE, L. The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of Leptospiraceae and related spirochaetes. *Journal of general microbiology*, v. 139, n. 11, p. 2585-2590, 1993.

JANWITTHAYANAN, W.; KEELAWAT, S.; PAYUNGORN, S.; LOWANITCHAPAT, A.; SUWANCHAROEN, D.; POOVORAWAN, Y.; CHIRATHAWORN, C. In vivo gene expression and immunoreactivity of

Leptospira collagenase. Microbiological research, v. 168, n. 5, p. 268-272, 2013.

JOBINS, S.E.; ALEXANDER, K.A. Evidence of *Leptospira* sp. Infection among a diversity of African wildlife species: beyond the usual suspects. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 109, n. 5, p. 349-351, 2015.

JOHNSON, R.C.; ROGERS, F.C. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. Journal of Bacteriology v. 88, p. 618–1623, 1964.

KMETZ, E.; DIKKEN, H. Classification of the Species *Leptospira interrogans* and History of its Serovars. University Press, Groningen, Netherlands, 1993.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. Journal of postgraduate medicine, v. 51, n. 3, p. 210, 2005.

LANGONI, H.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; CABRAL, K.G.; SILVA, A.V. Perfil sorológico da Leptospirose Bovina em regiões do estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol., v. 67, n. 1, 2000.

LANGONI, H.; SOUZA, L.C.; DA SILVA, A.V.; CUNHA, E.L.P.; SILVA, R.C. Epidemiological aspects in Leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp. antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brasil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., v. 45, n. 3, p. 190-199, 2008.

LEHMANN, J.S.; MATTHIAS, M.A.; VINETZ, J.M.; FOUTS, D.E. Leptospiral pathogenomics. Pathogens, v. 3, n. 2, p. 280-308, 2014.

LEVETT PN, HAAKE DA. *Leptospira* Species (Leptospirosis). In: Mandell LG, Bennett EJ, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition. Philadelphia: Elsevier. 2010. Pp. 3059–3065.

LEVETT, P.N.; MOREY, R.E.; GALLOWAY, R.L.; TURNER, D.E.; STEIGERWALT, A.G.; MAYER, L.W. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 45-49, 2005.

LEVETT, P.N.; SMYTHE, L. International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 1071-1072, 2014.

LEVETT, Paul N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis?. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v. 4, n. 6, p. 435-448, 2004

LILENBAUM, W.; MARTINS, G. Leptospirosis in cattle: A challenge scenario for the understanding of the epidemiology. *Transboundary and Emerging Disease*, v. 61, n. 1, p. 63-68, 2014.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDAO, F.Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; BRANDAO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; 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.

MACIEL, E.A.P.; DE CARVALHO, A.L.F.; NASCIMENTO, S.F.; DE MATOS, R.B.; GOUVEIA, E.L.; REIS, M.G.; KO, A.I. Household transmission of *Leptospira* infection in Urban Slum Communities. *Plos neglected tropical diseases*, v. 2, n. 1, p. e154, 2008.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection I tropical regions. *BMC Veterinary Research*, v. 9, p. 237, 2013.

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, R.C.K.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDAO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequente infectious disease impairing productivity in small

ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44, n. 4, p. 773-777, 2012.

MARTINS, G.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. The dog in the transmission of human leptospirosis under tropical conditions: victim or villain? *Epidemiol Infect*, .v. 140, p. 207-208, author reply 208–209, 2012.

Mc BRIDE, A.J.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRON, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MINEIRO, A.L.B.B.; BEZERRA, E.E.A.; VASCONCELLOS, S.A.; COSTA, F.A.L.; MACEDO, N.A. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 5, p. 1103-1109, 2007.

MINISTERIO DA SAUDE. Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, grandes regiões e Unidades Federativas 2007-2015. SINAN/SVS/MS. 2015.

MIRAGLIA, F.; MATSUO, M.; MORAIS, Z.M.; DELLAGOSTIN, O.A.; SEIXAS, F.K.; FREITAS, J.C.; HARTSKEERL, R.; MORENO, L.Z.; COSTA, B.L.; SOUZA, G.O.; VASCONCELLOS, S.A.; MORENO, A.M. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 77, n. 3, p. 195-199, 2013.

MURRAY, G.L.; ELLIS, K.M.; LO, M.; ADLER, B. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes and Infection*, v. 10, n. 7, p. 791-797, 2008.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 46, n. 4, p. 245-252, 2013.

OLIVEIRA, F.C.S.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO, S.R.; VIEGAS, S.A.R.A.; BATISTA, C.S.A.; COELHO, C.P.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; GONCALVES, A.P.; ALMEIDA, C.A.S.; VASCONCELLOS, S.A. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. *Arq. Inst. Biol.*, v. 76, n. 4, p. 539-546, 2009.

OLIVEIRA, R.; DE MORAIS, Z.M.; GONCALES, A.P.; ROMERO, E.C.; VASCONCELLOS, S.A.; NASCIMENTO, A.L.T.O. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e21962, 2011.

PAIXAO, M.S. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Leptospira* spp. em animais silvestres e em roedores procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira, SP. Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2013. Dissertação de Mestrado.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 43, n. 1, p.1-9, 2013.

PINNE, M.; HAAKE, D.A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS One*, v. 4, n.6, e6071, 2009.

PINTO, P.S.; LOUREIRO, A.P.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Tropica*, v. 149, p. 163-167, 2015.

RAO, R.S.; GUPTA, N.; BHALLA, P.; AGARWAL, S.K. Leptospirosis in India and the rest of the world. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 7, n. 3, p. 178-193, 2003.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; DA CRUZ MCBRIDE, F.W.; FIGUEIRA, C.P.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRONS, I.S.; KO, A.I.; PICARDEAU, M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS pathogens*, v. 3, n. 7, p. e97, 2007.

SALDANHA, G.B.; CAVAZINI, N.C.; DA SILVA, A.S.; FERNANDES, M.B.; BADKE, M.R.T.; PIVETTA, C.G. Sorologia positiva para *Leptospira butembo* em bovinos apresentando problemas reprodutivos. *Ciência rural*, v. 37, n. 4, p. 1182-1184, 2007.

SALGADO, M.; OTTO, B.; SANDOVAL, E.; REINHARDT, G.; BOQVIST, S. A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research*, v. 10, p. 126, 2014.

SARKAR, J.; CHOPRA, A.; KATAGERI, B.; RAJ, H.; GOEL, A. Leptospirosis: a re-emerging infection. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, v. 5, n. 6, p. 500-502, 2012.

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J.E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, v. 56, n. 3, p. 159-179, 2015.

SEDIGHEH, Z.; NARGESS, K.; ZAHRA, F.G.; NEDA, S.; ABDOL-ALI, M.; MOHAMMAD, M.G.; NAVID, D.D. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Journal of Infectious, Genetics and Evolution*, v. 10, p. 273-277, 2010.

SILVA, F.J.; CONCEICAO, W.L.F.; FAGLIARI, J.J.; GIRIO, R.J.S.; DIAS, R.A.; BORBA, M.R.; MATHIAS, L.A. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 32, n. 4, 2012.

STEVENSON, B.; CHOY, H.A.; PINNE, M.; ROTONDI, M.L.; MILLER, M.C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A.E.; CREAMER, T.P.; SUCHARD, M.A.; BRISSETTE C.A.; VERMA, A.; HAAKE, D.A. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One*, v. 2, n. 11, p. e1188, 2007.

STODDARD, R.A.; GEE, J.E.; WILKINS, P.P.; McCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A.R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 64, p. 247-255, 2009.

TONIN, A.A.; AZEVEDO, M.I.; ESCOBAR, T.P.; CASASSOLA, I.; DOS SANTOS, L.G.; DA SILVA, A.S.; MARTINS, J.L.R.; SHAEFER, P.C.; BADKE, M.R.T. Leptospirose bovina: aumento na incidência da *Leptospira interrogans* sorovar Butembo no rebanho do estado de Santa Catarina, Brasil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 4, n. 4, p. 294-297, 2010.

TSCHOPP, R.; ABERA, B.; SOUROU, S.Y.; GUERNE-BLEICH, E.; ASEFFA, A.; WUBETE, A.; ZINSSTAG, J.; YOUNG D. Bovine tuberculosis and brucellosis prevalence in cattle from selected milk cooperatives in Arsi zone, Oromia region, Ethiopia. *BMV Vet Res*, v. 13, n. 9, p. 163, 2013.

ULLMANN, L.S.; HOFFMANN, J.L.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; DOS SANTOS L.C.; DA SILVA, R.C.; MOREIRA, N.; GUIMARAES, A.M.S.; CAMOSSI, L.G.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W. Serologic survey for *Leptospira* spp. in captive neotropical felids in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 43, n. 2, p. 223-228, 2012.

VALVERDE, M.D.L.A.; RAMIREZ, J.M.; DE OCA, L.M.; GORIS, M.G.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R.A. Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. *Infection, Genetics and Evolution*, v, 8, n. 5, p. 529-533, 2008.

VARGES, R.; RISTOW, P.; LILENBAUM, W. Implementation of environmental changes augmented vaccination and antibiotic therapy to control an apparent *Leptospira Borgpetersenii* serovar Hardjo infection in a dairy herd. In: international Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics proceedings.. *Anais eletrônicos 12th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Durban, South África, 2009.

WAGGONER, J.J.; BALASSIANO, I.; MOHAMED-HADLEY, A.; VITAL-BRAZIL, J.M.; SAHOO, M.K.; PINSKY, B.A. Reverse-Transcriptase PCR Detection of *Leptospira*: Abscense of Agreement with Single-Specimen Microscopic Agglutination Testing. *Plos One*, v. 10, n. 7, e0132988, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH [OIE]. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE. Leptospirosis. 2013.

XUE, F.; YAN, J.; PICARDEAU, M.. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes and infection*, v. 11, n. 3, p. 328-333, 2009

ZAVITSANOU, A.; BABATSIKOU, F. Leptospirosis: epidemiology and preventive measures. *Health Sci J*, v. 2, n. 2, p. 75-82, 2008.

TRABALHO CIENTÍFICO

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado como artigo curto à “Revista de Medicina Veterinária – Universidad de La Salle”

<http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/index>

Avaliação sorológica de leptospirose em bovinos reprodutores da região Centro-Oeste do estado de São Paulo, Brasil

“Serological evaluation of leptospirosis in reproductive bovines from midwest region of Sao Paulo state, Brazil”

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de grande impacto mundial na saúde animal e saúde pública. Esta doença tem como agente infeccioso as espiroquetas do gênero *Leptospira* spp., com espécies patogênicas e não patogênicas. Em animais de produção como os bovinos o quadro clínico manifesta-se geralmente com falhas reprodutivas, como abortos e infertilidade, ocasionando prejuízo econômico nas fazendas, além de representar risco à saúde dos trabalhadores que lidam direta ou indiretamente com os animais. Oito rebanhos com um total de 296 bovinos reprodutores em total foram analisados sorologicamente pelo teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM), para avaliar a prevalência de leptospirose em bovinos reprodutores da região Centro-Oeste do estado de São Paulo, Brasil. Dezesete sorogrupos patogênicos foram usados ao SAM. Os oito rebanhos (100%) foram soropositivos a pelo menos um sorogrupo patogênico de *Leptospira* spp.; dos 296 animais destes rebanhos, 82,8% (245/296) dos bovinos reagiram ao teste de Soroaglutinação. Os sorogrupos mais prevalentes foram Sejroe e Autumnalis, presentes nos oito rebanhos. Com este estudo ratifica-se a grande e preocupante disseminação destes sorogrupos nos bovinos reprodutores da região, recomendando-se adotar medidas profiláticas como vacinação sistemática, tratamento de animais e melhoramento das condições higiênico-sanitárias das fazendas avaliadas; para consequentemente minimizar os fatores de risco de infecções aos humanos em contato com esses animais.

Palavras chave: leptospira, leptospirose, zoonose, diagnóstico

SUMMARY

Leptospirosis is a worldwide zoonosis of great impact in animal and public health. The etiological agent of this disease are spirochetes of genus *Leptospira* spp., classified in pathogenic and nonpathogenic species. In farm animals, such as cattle, the clinical presentation involves reproductive failure, like abortion and infertility, causing economical losses, furthermore represents a health risk for workers who keep direct or indirect contact with farm animals. Eight flocks with a total of 296 bovines (259 cows and 37 bulls) were analyzed serologically by Microagglutination test (MAT) to evaluate the prevalence of leptospirosis in reproductive cattle from midwest region of Sao Paulo state, Brasil. Seventeen pathogenic serogroups were used for MAT. All of the flocks (100%) were seropositive to at least one pathogenic serogroup of *Leptospira* spp.; from the 296 bovines from these flocks, 82.8% (245/296) reacted to MAT. The most prevalent serogroups were Sejroe and Autumnalis, present in eight flocks. This study confirms the great and concerning dissemination of these serovars in reproductive cattle from the region, recommending the adoption of prophylactic measures, such as systemic vaccination, treatment of animals and improvement of hygienic-sanitary conditions. From a One Health perspective, this study will help in the disease knowledge to minimize risk factors for the infection in humans in contact with these animals

Key words: leptospira, leptospirosis, zoonosis, diagnostic

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis de gran impacto mundial en la salud animal y salud pública. Esta enfermedad tiene como agente infeccioso a las espiroquetas del género *Leptospira* spp., las cuales tienen especies patógenas y no patógenas. En animales de producción, como los bovinos, el cuadro clínico se manifiesta generalmente con fallas reproductivas, como aborto e infertilidad, ocasionando pérdidas económicas en las granjas, además de representar un riesgo para la salud de los trabajadores que lidian directa o

indirectamente como estos animales. Ocho rebaños con un total de 296 bovinos (259 vacas y 37 toros) fueron analizados serológicamente, a través de la prueba de Microaglutinación (MAT), para evaluar la prevalencia de la leptospirosis en bovinos reproductores de la región centro-oeste del estado de Sao Paulo, Brasil. Diecisiete serogrupos patógenos fueron usados en el MAT. Los ocho rebaños (100%) fueron seropositivos a por lo menos un serogrupo patógeno de *Leptospira* spp.; de los 296 animales de estos rebaños, 82,8% (245/296) bovinos fueron positivos en la prueba de Microaglutinación. Los serogrupos más prevalentes fueron Sejroe y Autumnalis. Con este estudio, se ratifica la grande y preocupante diseminación de estos serogrupos en los bovinos reproductores de la región, recomendándose adoptar medidas profilácticas como vacunación sistemática, tratamiento de animales y mejoramiento de condiciones higienico-sanitarias en las granjas estudiadas; para como consecuencia, minimizar los factores de riesgo de las infecciones a humanos en contacto con estos animales.

Palavras clave: leptospira, leptospirosis, zoonosis. diagnóstico

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por membros do gênero *Leptospira* spp., que inclui mais de 16 espécies geneticamente identificadas e mais de 250 sorovares, categorizados em sorogrupos (1, 2) Esta zoonose tem um grande impacto na saúde animal e saúde pública a nível mundial (3).

O homem e outros animais podem-se infectar de forma direta pelo contato das mucosas e/ou pele com leptospirosas presentes na urina e, de forma indireta, ao beber água e alimentos contaminados. Os reservatórios envolvidos na transmissão da enfermidade compreendem uma variedade de animais domésticos, tais como bovinos, ovinos, caprinos, suínos, equinos, caninos e felinos, bem como animais silvestres (4, 5).

Na saúde pública a leptospirose é caracterizada como uma doença ocupacional e recebe diferentes denominações segundo as condições nas quais a transmissão é produzida. O grau e natureza da exposição dependem muitas vezes das atividades ocupacionais e/ou atividades recreativas e

sociais. Os trabalhadores das fazendas que lidam diretamente com os animais podem-se infectar durante suas atividades laborais – manipulando fetos abortados, envoltórios fetais, ou entrando em contato direto com a urina dos animais infectados (3).

No Brasil, a leptospirose é endêmica e é considerada um dos maiores problemas de saúde pública, tendo sido notificados 34532 casos de enfermidade no período entre 2007 a 2015 (6). A taxa de mortalidade da doença de Weil (forma grave) e da síndrome hemorrágica pulmonar severa é de >10% e 74%, respectivamente (7,8). Alguns estudos sugerem que a leptospirose pode representar entre 20 a 40% das doenças febris de origem desconhecida (9).

No mundo, a leptospirose tem sido reportada como uma das maiores causas de falhas reprodutivas nos bovinos e em outros ruminantes, trazendo perdas econômicas que decorrem de transtornos reprodutivos como infertilidade, aborto, nascimento de bezerros fracos e diminuição temporária da produção leiteira (5). No Brasil, tem se estimado que ao redor de 30% do rebanho bovino apresentaram falhas reprodutivas a cada ano (10). Ainda que a importância das doenças infecciosas de caráter abortivo nas manifestações clínicas não tenha sido quantificada claramente, é óbvio que estas doenças representam uma causa importante das falhas reprodutivas, principalmente nos países em desenvolvimento (11).

A soroprevalência da leptospirose em rebanhos bovinos brasileiros varia de 14% a 98,8%, sendo o clima da região de estudo um fator epidemiológico relevante. Os inquéritos realizados evidenciam como importantes principalmente os sorogrupos Sejroe (Hardjo e Wolffi), Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Canicola, sendo mais prevalente o primeiro (12; 13, 14, 15, 16, 17). A doença nos bovinos é geralmente de caráter crônico, apresentando-se como distúrbios reprodutivos. Os sinais clínicos da doença de tipo aguda são mais evidentes nos animais jovens do que nos adultos, sendo mais frequente a mortalidade em bezerros (18).

Diferentes autores discutem que a melhor maneira de reduzir a soropositividade nos animais seria a adoção de medidas ambientais preventivas, como evitar o acesso dos animais a fontes de água de

procedência duvidosa, as quais possam ser fonte de infecção; além disso, assumir outras medidas de controle, tais como vacinação periódica dos animais e tratamento com drogas específicas (19).

Devido à importância desta zoonose para o rebanho bovino e aos problemas reprodutivos associados a ela, além da sua importância pelas perdas econômicas e pela relevância em saúde pública, pretende-se com este estudo avaliar a prevalência da leptospirose e identificação dos sorogrupos patogênicos de *Leptospira* spp. mais frequentes em bovinos de fazendas de cria.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram amostrados 296 bovinos reprodutores (259 vacas e 37 touros) provenientes de oito rebanhos, localizados em duas fazendas de cria da região Centro-Oeste do estado de São Paul, Brasil.. As duas fazendas não tinham um programa de vacinação contra leptospirose, porém tinham histórico de abortos e repetição de cios.

Coleta de amostras

Foi coletado o sangue em seringas estéreis e posteriormente foi dispensado em tubos de vidro estéreis de aproximadamente 5 – 10 ml, sendo que os tubos não continham anticoagulante. Os tubos foram devidamente identificados para cada animal e acondicionados sob temperatura de refrigeração em caixa isotérmica com gelo reciclável até a chegada ao laboratório.

No laboratório, foi separado o soro de cada amostra obtida e foi acondicionada em microtubos de 1,5 mL até a realização do teste de Microaglutinação (SAM).

Soroaglutinação Microscópica (SAM)

O teste de SAM foi realizado segundo as normas do Ministério da Saúde (4). Como antígenos para a prova foram utilizados culturas vivas de *Leptospira* spp. mantidas em estufa de 28°C a 30°C, faixa de temperatura ideal para o seu desenvolvimento, com quatro a 14 dias de crescimento, e que não

apresentaram contaminantes e nem auto-aglutinações. Contou-se com uma bateria de 17 sorovares patogênicos pertencentes aos 17 sorogrupos mais comuns em animais de produção (quadro 1), mantidos no laboratório de Laboratório de Sanidade Animal da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Pólo Centro-Oeste – Bauru – SP. O ponto de corte utilizado foi de 1/100 (20).

Quadro 1. Bateria de sorogrupos utilizados na técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM).

ESPÉCIE	SOROGRUPO	SOROVAR	CEPA
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Butembo	Butembo
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. weilli</i>	Celledoni	Whitcombi	Whitcombi
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3552 C
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Sentot	Sentot
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46/RA 94
<i>L. noguchi</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	LT 821

RESULTADOS

Dos oito rebanhos avaliados (296 animais), 100% dos rebanhos apresentaram títulos a pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp.; sendo que dos 296 animais, 82,8% (245/296) foram positivos à prova de SAM para os

sorogrupos patogênicos avaliados. Encontrou-se soropositividade para 13 dos 17 sorogrupos avaliados, tendo-se verificado os sorogrupos Sejroe, Autumnalis e Hebdomadis como o mais frequentes. Os sorogrupos não reagentes foram Ballum, Bataviae, Celledoni e Javanica (figura 1).

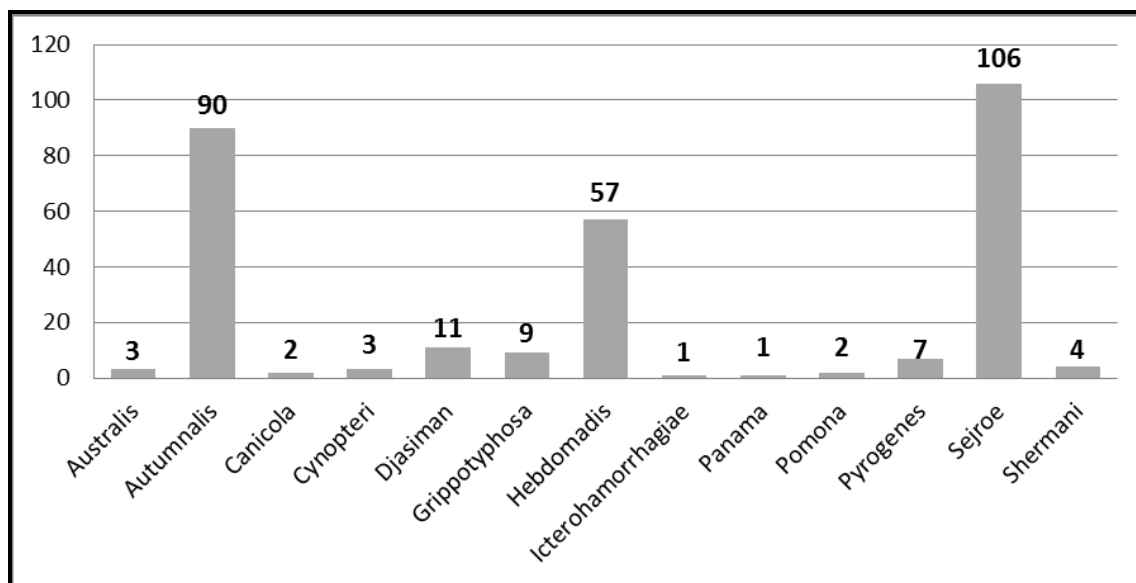


Fig 1. Animais soropositivos aos sorogrupos patogênicos de *Leptospira* spp. utilizados no estudo.

DISCUSSÃO

No Brasil, verifica-se que a leptospirose é uma das doenças reprodutivas com maior importância nos animais de produção, já que ocasiona grandes prejuízos econômicos nas fazendas onde se apresenta a infecção. A magnitude desta importância se vê refletida nos estudos de soroprevalência descritos nas cinco regiões brasileiras, onde se mostram prevalências variáveis de no mínimo 14% até 98,8% (Quadro 2).

Quadro 2. Principais estudos de soroprevalência de leptospirose bovina no Brasil.

Região	Estado	Prevalência	Animais	Sorovares mais prevalentes	Referências
Norte	Maranhão	35,94%	4832 vacas	Hardjo e Wolffi.	16

Nordeste	Bahía	45,42%	10 823	Hardjo	14
Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	98,8%	1801 vacas	Hardjo e Wolffi	13
Sul	Santa Catarina	65,53%	3945 vacas	Hardjo, Wolffi e Butembo.	15
Sudeste	Rio de Janeiro	14%	120 vacas	Tarassovi e Hardjo	17
	São Paulo	45,8%	2761 bovinos	Wolffi e Hardjo	12

Dentre os animais reagentes (245), observou-se que o sorogrupo mais frequente foi Sejroe, cujos sorovares mais representativos (Hardjo e Wolffi) tem sido registrados em diversos estudos brasileiros, como indicado no quadro anterior. Este sorogrupo geralmente está implicado em casos de leptospirose subclínica (18), podendo ocasionar um constante prejuízo económico (por problemas reprodutivos) e risco de infecção para os trabalhadores das fazendas avaliadas.

Podemos ressaltar que no presente estudo, determinou-se 30,4% (90/296) de bovinos soropositivos ao sorogrupo Autumnalis e 19,3% (57/296) de soropositividade ao sorogrupo Hebdomadis; porcentagem significativa considerando-se que não se trata de sorogrupos comuns na espécie bovina. Tais sorogrupos são frequentes em animais silvestres (21,22) e, tendo em vista que estes animais encontram-se muitas vezes em proximidade com bovinos, estes últimos encontram-se expostos à contaminação de água e pastagens com a urina dos animais silvestres.

Considerando a resposta sorológica dos animais amostrados, que pode indicar a presença da fase crónica da doença ou de animais reservatórios, ainda em diferentes frequências, podemos ratificar a notável presença da doença nas fazendas avaliadas. Essa informação, associada à falta de medidas profiláticas (ausência de cronograma de vacinação para leptospirose) confirma o risco que esses animais representam não somente como prejuízo económico nas fazendas (tratamento e implantações de medidas profiláticas),

mas também o risco de saúde pública para os trabalhadores que lidam com os bovinos na rotina diária.

CONCLUSÕES

Os resultados representam um alerta para o estado sanitário da leptospirose em bovinos de fazendas de cria na região estudada, já que os mesmos apresentaram-se reagentes a diferentes sorogrupos patogênicos de leptospirosas de importância epidemiológica na leptospirose bovina e em animais silvestres, demonstrando exposição prévia ao agente e uma possível disseminação por contato direto ou indireto entre diferentes espécies animais.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios – APTA, Polo Centro Oeste, Bauru

REFERENCIAS

1. LEVETT, Paul N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis?. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v. 4, n. 6, p. 435-448, 2004
2. ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.
3. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Washington, EUA. 2003. p. 175-186.
4. BRASIL. Manual de Leptospirose. 2da ed. Fundação Nacional de Saúde, Ministerio de Saúde. Brasília, 1995. 98p.
5. MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, R.C.K.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDAO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequente infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44, n. 4, p. 773-777, 2012.

6. MINISTERIO DA SAUDE. Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, grandes regiões e Unidades Federativas 2007-2015. SINAN/SVS/MS. 2015.
7. Mc BRIDE, A.J.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005
8. GOUVEIA, E.L.; METCALFE, J.; CARVALHO, A.L.F.; AIRES, T.S.F.; VILLALOBOS-BISNETO, J.C.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.C.; SALGADO K.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhage Syndrome, Salvador, Brazil. *Emer. Infect. Dis.*, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008.
9. ABELA-RIDDER, B.; SIKKEMA, R.; HARTSKEERL, R.A. Estimating the burden of human leptospirosis. *International journal of antimicrobial agents*, v. 36, p. S5-S7, 2010.
10. BARUSELLI, P.S.; FILHO, M.F.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; VIEIRA, L.M.; MENDANHA, M.F.; BO, G.A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 4, n. 4, p. 134-141, 2012.
11. TSCHOPP, R.; ABERA, B.; SOUROU, S.Y.; GUERNE-BLEICH, E.; ASEFFA, A.; WUBETE, A.; ZINSSTAG, J.; YOUNG D. Bovine tuberculosis and brucellosis prevalence in cattle from selected milk cooperatives in Arsi zone, Oromia region, Ethiopia. *BMV Vet Res*, v. 13, n. 9, p. 163, 2013.
12. LANGONI, H.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; CABRAL, K.G.; SILVA, A.V. Perfil sorológico da Leptospirose Bovina em regiões do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v. 67, n. 1, 2000.
13. FIGUEREIDO, A.; PELLEGRIN, A.O.; GONCALVES, V.S.P.; FREITAS, E.B.; MONTEIRO, L.A.; OLIVEIRA, J.M.; OSORIO, A.L. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras*, v. 29, n. 5, p. 375-381, 2009.
14. OLIVEIRA, F.C.S.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO, S.R.; VIEGAS, S.A.R.A.; BATISTA, C.S.A.; COELHO, C.P.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; GONCALVES, A.P.; ALMEIDA, C.A.S.; VASCONCELLOS, S.A.

- Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. *Arq. Inst. Biol.*, v. 76, n. 4, p. 539-546, 2009.
15. TONIN, A.A.; AZEVEDO, M.I.; ESCOBAR, T.P.; CASASSOLA, I.; DOS SANTOS, L.G.; DA SILVA, A.S.; MARTINS, J.L.R.; SHAEFER, P.C.; BADKE, M.R.T. Leptospirose bovina: aumento na incidência da *Leptospira interrogans* sorovar Butembo no rebanho do estado de Santa Catarina, Brasil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 4, n. 4, p. 294-297, 2010.
 16. SILVA, F.J.; CONCEICAO, W.L.F.; FAGLIARI, J.J.; GIRIO, R.J.S.; DIAS, R.A.; BORBA, M.R.; MATHIAS, L.A. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 32, n. 4, 2012.
 17. FOLLY, M.M.; DA SILVA, L.G.; PEREIRA, M.M.; DE SOUZA, G.V.; DA SILVA, T.F. Anti-*Leptospira* agglutinins in farm workers, bovines and canines performed in the microregion of Itaperuna, Rio de Janeiro, Brazil. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, v. 6, n. 11, p. 406-417, 2013.
 18. LILENBAUM, W.; MARTINS, G. Leptospirosis in cattle: A challenge scenario for the understanding of the epidemiology. *Transboundary and Emerging Disease*, v. 61, n. 1, p. 63-68, 2014.
 19. VARGES, R.; RISTOW, P.; LILENBAUM, W. Implementation of environmental changes augmented vaccination and antibiotic therapy to control an apparent *Leptospira Borgpetersenii* serovar Hardjo infection in a dairy herd. In: international Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics proceedings.. *Anais eletrônicos 12th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Durban, South África, 2009.
 20. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH [OIE]. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE. Leptospirosis. 2013.
 21. ULLMANN, L.S.; HOFFMANN, J.L.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; DOS SANTOS L.C.; DA SILVA, R.C.; MOREIRA, N.; GUIMARAES, A.M.S.; CAMOSSO, L.G.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W. Serologic survey for *Leptospira* spp. in captive neotropical felids in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 43, n. 2, p. 223-228, 2012.

22. PAIXAO, M.S. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Leptospira* spp. em animais silvestres e em roedores procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira, SP. Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2013. Dissertação de Mestrado.

ANEXOS

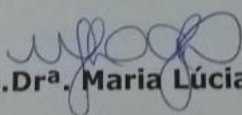
10. ANEXOS

ANEXO 1

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **"Soroprevalência, isolamento e diagnóstico molecular para leptospirose em bovinos de fazendas de cria e de centrais de receptoras de embrião da região de Bauru-SP"** Protocolo nº 187/2014 - CEUA, de **Gabriela Pacheco Sanchez**, desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 12 de dezembro de 2014.


Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 2

Protocolo de extração de DNA - kit Illustra Blood™ genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare^R)

1. Adicionar 20 uL de proteinase K em um microtubo.
2. Adicionar 300 uL de sangue total nesse mesmo microtubo.
3. Adicionar 400 uL de buffer de lisis e misturar usando o vortex por 15 segundos.
4. Incubar o microtubo na temperatura ambiente por 10 minutos
5. Centrifugar rapidamente para homogeneizar a amostra.
6. Paralelamente, montar uma minicoluna de sílica dentro de um tubo coletor.
7. Adicionar o conteúdo do microtubo dentro da minicoluna.
8. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 rcf.
9. Remover o tubo coletor para descartar o conteúdo e montar a minicoluna no mesmo tubo coletor.
10. Adicionar 500 uL de buffer de lisis à coluna.
11. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 rcf.
12. Descartar o conteúdo do tubo coletor e monta a minicoluna novamente nele.
13. Adicionar 500 uL de buffer de lavagem à coluna.
14. Centrifugar por três minutos a 11 000 rcf e descartar o tubo coletor, todo ele.
15. Insertar a coluna em um microtubo novo livre de DNase.
16. Adicionar 200 uL do buffer de eluição, preaquecido a 70 °C.
17. Deixar incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
18. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 rcf.
19. Desprezar a coluna e guardar o microtubo com o DNA a -20 °C.

ANEXO 3

Protocolo de extração de DNA de sêmen – Reagente DNazol (Life Technologies^R)

1. Adicionar 100 uL da amostra em um microtubo livre de DNAsas.
2. Adicionar 1 mL do reagente DNazol no microtubo contendo a amostra.
3. Centrifugar a 10 000 rcf por 10 minutos.
4. Transferir o sobrenadante a um microtubo novo.
5. Adicionar 0.5 mL de etanol 100% no microtubo contendo o sobrenadante.
6. Homogeneizar invertendo o microtubo muitas vezes.
7. Incubar na temperatura ambiente por 1 – 3 minutos.
8. Centrifugar a 4000 rcf por 2 minutos.
9. Retirar o DNA do fundo do microtubo utilizando as ponteiras. Passar o DNA retirado a um microtubo novo.
10. Adicionar 0.8 – 1 mL de etanol ao 75% no microtubo com o DNA.
11. Lavar o DNA invertendo o microtubo de 3 -6 vezes.
12. Manter os microtubos verticais por 30-60 segundos para permitir que o DNA se assente no fundo e depois decantar o etanol.
13. Repetir 10 – 12.
14. Secar o etanol dos microtubos deixando eles repousando por 5-15 segundos com as tampas abertas.
15. Adicionar 0.2-0.3 mL de 8 mM NaOH.
16. Dissolver o DNA passando o pellet pela pipeta.
17. Centrifugar o microtubo a 12 000 rcf por 10 minutos para remover matérias insolúveis.
18. Transferir o sobrenadante contendo o DNA a um microtubo novo.
19. Ajustar o pH utilizando o HEPES.

ANEXO 4

Termos de consentimento dos proprietários das fazendas



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo realização do procedimento COLETA DE SANGUE E SÊMEN BOVINO, referente o Projeto de Pesquisa intitulado **SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DE FAZENDAS DE CRIA E DE CENTRAIS DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO DA REGIÃO DE BAURU- SP**, de responsabilidade de Gabriela Pacheco Sánchez.

Nome do responsável pela pesquisa: **Gabriela Pacheco Sánchez**

Nome do responsável pelos animais: *Leandro Henrique de Lima*

RG: *34 854 108-9*

Assinatura: *Leandro H. de Lima*

Data:

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Zoonoses

Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000

☎ 14-3811-6270 – fax: 14-3811-6075 ✉ higie@fmvz.unesp.br – □ www.fmvz.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo realização do procedimento COLETA DE SANGUE BOVINO, referente o Projeto de Pesquisa intitulado **SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DE FAZENDAS DE CRIA E DE CENTRAIS DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO DA REGIÃO DE BAURU- SP**, de responsabilidade de Gabriela Pacheco Sánchez.

Nome do responsável pela pesquisa: **Gabriela Pacheco Sánchez**

Nome do responsável pelos animais: *MANOEL AUGUSTO CARDOSO FILHO*

RG: *2983103*

Assinatura:

Data:

14/3/16

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Zoonoses
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 13618-000



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo realização do procedimento COLETA DE SANGUE BOVINO, referente o Projeto de Pesquisa intitulado **SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DE FAZENDAS DE CRIA E DE CENTRAIS DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO DA REGIÃO DE BAURU- SP**, de responsabilidade de Gabriela Pacheco Sánchez.

Nome do responsável pela pesquisa: **Gabriela Pacheco Sánchez**

Nome do responsável pelos animais: *FÁBIO ALMEIDA DE LEMOS*

RG: 09372586-9 IEP-RJ

Assinatura:

F. S.
Fábio A. de Lemos
CRMV-SP 11343
CDA 1452-68/02
HAB. 532/05

Data:

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Zoonoses

Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000

☎ 14-3811-6270 – fax: 14-3811-6075 ✉ higvet@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

APÉNDICE

**LISTA DE CÓDIGOS DOS SOROVARES USADOS NA ROTINA DO LABORATÓRIO
DE SANIDADE ANIMAL – LASAB - APTA/SAA, BAURU**

CÓDIGO	SOROVAR
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
22	Guaricura
BOV	Hardjobovis
CTG	HardjoCTG
MIN	Mini
PRA	HardjoPrajitno
NUP	Nupezoz

1. Fazendas de cria 1: Touros

		1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP																															
N	Id																																																														
1	209	100														100														200																																	
2	2727																															400																															
3	397											200														100		200				200		200		800		400																									
4	12589																					100														100																											
5	4268	100		100												100		100												100		400				200		100		800		800																					
6	13134											200														200		800												800		400		1600		200		1600															
7	771																																																	200													
8	1295											100																																																			
9	12698											100														200		200												200		200		800		100		1600															
10	12678											100														100														100		400				400																	
11	12940																																																														
12	385											100														100		200												100		200		400				400															
13	12802											200														400		800												400		100		800		800		1600		100													
14	13138																																																			800											
15	2836											100																																				800		100													
16	387											100																																				800		200													
17	13155																					200		100												100		100		400				800																			
18	12634											200																200														100		400				200															
19	13273											100																																																			
20	12705																																																														
21	7777																					100																								100		200				200											
22	13095																					100																												200		100		200									
23	12650																					400		800												400		200		800				800																			
24	12978											100														200		200												200		100		400				400															
25	13096											100				100		100												200														100												100				100		200	

2. Fazenda de cria 1: Vacas

[illegible]

N	Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP																												
28	13010				100																100																																							
29	959																				100												400		100	400																								
30	1224																																																											100
31	1523																																																											
32	128																				100																													200	800				400	200	400	100	1600	
33	13182																																																		100						100		400	
34	788																				100																													100	100				200	100	200		800	
35	1151																				100																																							
36	1487																				100																														200					100		100		400
37	13079																																																200		200					100		200		400
38	1078				100								200								200	800					200	200	800	200	1600																													
39	892		200		100																																																							
40	1144				100																																																							
41	202				200								200								200	800					200	200	200	100	400																													
42	1084																				100	100						200	200		400																													
43	13297																				100	100					100		400		100																													
44	1617				400						100										200	800					200	200	800		1600																													
45	13261																				100	200					200		400		400																													
46	13231																				100	400					200		400		800																													
47	13302				100																																																							
48	1601				100																200	800					400	400	800		1600																													
49	14187												400								800	6400					3200	3200	6400	100	6400																													
50	1769																												100			100																												
51	3486				100																					100																																		
52	3408													100								200					100		400	200	200																													
53	1693				100									100							400	800					400	200	400		800																													
54	719				100																										100																													
55	1279				100																										200																													
56	1051	100																				200						200	200		800																													
57	1541												200								400	400					200	400	800	200	3200																													

N	Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP																																	
58	1650	100	100																																																														
59	1723																																		100							800	1600																						
60	2035																																																																
61	1738																																																			100	400						200	200	400		1600		
62	9854																																																												100		200		
63	1324																																																			100													
64	1875																																																													100		200	
65	648																																																																
66	1050																																																				200									100		400	
67	1787																																				100															100													
68	1679												100									100								100		400																																	
69	9888																																																																
70	1587												200								800	1600					400	800	400	200	6400																																		
71	928				100															400										100																																			
72	1665																				200	200					200	200	400		800																																		
73	3498																																																																
74	1621												100								100	200					100		200	100	1600																																		
75	1626				100																	200			100	100	100	200			200																																		
76	920																					100								100																																			
77	3441				200					200				200							200	1600					400	100	400	100	1600	1600																																	
78	3461												100								200	1600					800	200	1600	200	3200																																		
79	1064																															100																																	
80	765																																																																
81	1676																															400																																	
82	1719																												400			400																																	
83	3493				100							400																																																					
84	2429											200																																																					
85	583																																																																
86	1591																								100		100					200																																	
87	1424												100								800	1600					800	400	3200		1600																																		

N	Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP
88	1610													400							400	1600					400	400	400	200	1600	
89	1552				200																											
90	3459													200							400	1600					800	400	800	100	1600	
91	276539																															
92	9853																															
93	13175																				100	400					100	100	200		800	
94	3490																															
95	883																			200											400	
96	1540																				200	1600					400	200	400		1600	
97	1311				100																										100	
98	s/i				100																										200	
99	1597																														100	
100	bordada																														200	
101	1720																														200	
102	13014																											100			200	
103	1658				100			100													100	400	400				200	400	400	100	1600	1600
104	gaivota																					100					100	100	200		200	

3. Fazenda de cria 2: Touros

N	Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP
1	1382	100			100						100										100	100						200			200	
2	441																															
3	1401																															
4	1381																															
5	1389																															
6	1385																															
7	1396																															
8	1395																															
9	1307																															
10	1394																															
11	1399																															
12	1398																															

4. Fazenda de cria 2: Vacas

N	Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP										
1	601																																									
2	1142																																									
3	47																																									
4	965																																200	200	100	200	1600	400	3200	1600	3200	400
5	14333																																100	100	200	100	100	800				
6	1183																																200									
7	688																																									
8	1435																																									
9	3616																																									
10	1187																																100	100								
11	1418	200	200	100	400	800	100																																			
12	68	100	200	400																																						
13	3444	200	100	100	200																																					
14	606																																									
15	14351																																									
16	1369	100	200																																							
17	14385	100	100	100	800	100	800	200																																		
18	832	100	100	100	200	100	800																																			
19	14379	100																																								
20	1197	100																																								
21	811	100	100	100	400	100	800																																			
22	521	100	200	400																																						
23	70863																																									
24	9094	100	200																																							
25	14248	100	100	100	400	200	800	100																																		
26	1136	100	100	200	200																																					
27	314	200																																								
28	14392	100	100																																							

N	Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP	
29	5076																																
30	691																			100	100						100			200			
31	3477																																
32	2816				100																		100										
33	2327				200															100	200					100	200			800		200	
34	1171																			100	200					100	200			800		100	
35	629				100																							100			200		
36	9399				100								100							200	400					100	100	400	200		800		
37	5032				200								200																				
38	917																					200							200			200	
39	9829																																
40	7905				200								200							400	3200					800	800	1600	400		3200		
41	78																																
42	9372												100							100	400					100	100	200			400		
43	102																				200								200			200	
44	974																																
45	1034												200							400	800					100	200	1600	400		400		
46	3522											100										800				100			100			200	
47	709												100							100	400					100	100	800			400		
48	14313																					100							200			200	
49	3575												100							100	200						100	200			400		
50	170																																
51	3680												100							200	800					100	100	400			400		
52	2642																				100								100			200	
53	199																																
54	245																			100	200					100	100	100			400		
55	158																			200	800					100	200	200			1600		
56	193																																
57	289																			100	400					200	200	200			400		
58	1762												100							200	400					100	100	800	100		400		

		Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP	
89		12																				100	400					200	100	400		800		
90		1095				100																												
91		186																																
92		139				100																100	100					100	100	200		400		
93		194																												100	200		200	
94		842				100								100								100	100						100	400		400		
95		21236																				100	100					100	100	400		400		
96		127																													100			
97		141																																
98		1099										100		100								100	400					200	200	800		400		
99		70																													200			
100		150																																
101		668												100																				
102		107								100																								200
103		1223																															100	
104		3	100			100								200								400	400					400	400	1600	200	800		
105		14396												200								400	800					200	400	800	200	800		
106		3669				100								200								100	400					100	200	400	100	400		
107		685				100																100	200					100	200	400		400		
108		433				200																	200										200	
109		3474				200																200	400					200	400	1600		1600		
110		340																				100	100							200		400		
111		299				100								100								100	200					100		400	100	200		
112		1897																					100						100	200		200		
113		988																					200								200		200	
114		3685										100											100			100				100	100	100		
115		3433												400								400	800					200	200	400	400	800		
116		272																																
117		75																																
118		1806																				100	400					200	400	200		1600		

	Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP
119	1811																															
120	1419				200																											
121	938																											100			100	
122	990												100								100	200				100	100	200			200	
123	3672				100																								100		200	
124	3692																				200							200			200	
125	1836				100																										100	
126	1120																															
127	1807																				100							100			200	
128	900																				100						100	100			200	
129	3670				200																				100							
130	1881																											100			100	
131	14347				200							100											100									
132	1784				100																											
133	1764				100																											100
134	1766				100																											200
135	9391				100								400								800	1600				400	800	1600	400		1600	
136	1771												400								400	400				200		200	100		800	
137	1188												100								100	100									200	
138	835				100																100	100						100			200	
139	1832												200								200	400				200	400	200			3200	
140	341																				200	200					100	100	100		200	
141	1795				100																											
142	1885				100																											
143	327				200																100	100						100				
144	30																															

N	Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP																																		
145	1155																100														100																																			
146	966																																																																	
147	208																																																																	
148	7011																400														400		800				200		400		800		400		3200																					
149	14394																100														100		100				100		100				100																							
150	78																																																																	
151	2633																100																																																	
152	866																																																																	
153	1856																200																														100						100													
154	1237																														100		100																				200													
155	1129																														100																100																			

5. Central de Receptoras de embrião 1:

[illegible]

6. Central de Receptoras de embrião 2:

N		Id	1A	1B	2A	2B	3	4A	5	6B	7	8A	8B	9	10	11A	11B	12	13	14A	15	16A	16B	17	18	19	21	22	BOV	CTG	MIN	PRA	NUP
1		256	100		100																	100	200						200		400		
2		251													100							200	1600					400	400	1600		3200	
3		266													200							200	3200	100				200	400	400	100	1600	
4		3053										100										100	200			100	100	100	400		400		
5		3531																				100	200						100	200		400	
6		61													100							200	400	200			200	100	200	100	800		
7		50																						100						100	100		
8		257																															
9		4													200							400	1600			100	800	800	1600	100	3200		
10	girada																																
11		29												200									400					100		200		400	
12		113																				100	200			100	100		200		400		
13		16													200							200	1600				100	200	800	200	400		
14		12																						100		100						100	
15		7	100																			200	400					400	200	1600		1600	
16		13																					800	100			800	400	1600		3200		
17		264												400								400	3200	100			400	400	1600	200	3200		
18		2				100																										100	
19		258				100						100																					
20		11				100																100	200	100			100	100	400		800		
21		265				100						100															100						
22		32																															
23	fumaça																																
24		963	200												200							400	200					200	400	800	100	800	
25		5																															
26		267												100								200	400				200	200	400		1600		
27	cara branca																					200	800				400	400	200		800		
28		8																				200	800				400	400	400		1600		
29	pintada														800							800	800			100	400	400	800	800	1600		
30		10				200																100										200	
31		9																														200	
32		2588																															
33		259																															
34		170																				400	400				200	200	400		800		
35		1																														200	
36	f.503																					200	100	200				200	200	100	1600		

