

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DA
INFECÇÃO POR *Leptospira* spp. EM REBANHOS BOVINOS
DE CORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

Renata Ferreira dos Santos

Médica Veterinária

2017

1310012590



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DA
INFECÇÃO POR *Leptospira* spp. EM REBANHOS BOVINOS
DE CORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

Renata Ferreira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Luis Antonio Mathias

Coorientadora: Dra. Danila Fernanda Rodrigues Frias

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva.

2017



CLAS	619:636 S237c
TOMBO	12590

986.7:636.2(043)=690

S237c Santos, Renata Ferreira dos
Caracterização soropidemiológica da infecção por *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos de corte do Estado de Mato Grosso do Sul / Renata Ferreira dos Santos. -- Jaboticabal, 2017
ix, 62 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Luis Antonio Mathias

Coorientadora: Danila Fernanda Rodrigues Frias

Banca examinadora: Anna Monteiro Correia Lima, Luiz Augusto do Amaral, Flávia Maria Esteves Machado, Raul José Silva Girio

Bibliografia

1. Leptospirose. 2. Bovinocultura de corte. 3. Soroaglutinação microscópica. 4. Estirpes brasileiras. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.986.7:636.2

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO POR *Leptospira* spp. EM REBANHOS BOVINOS DE CORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL

AUTORA: RENATA FERREIRA DOS SANTOS

ORIENTADOR: LUÍS ANTONIO MATHIAS

COORDINADORA: DANILA FERNANDA RODRIGUES FRIAS

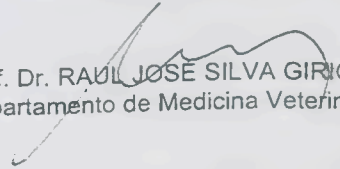
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUÍS ANTONIO MATHIAS
Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. ANNA MONTEIRO CORREIA LIMA
Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) / UFU - Uberlândia/MG


Prof. Dr. LUÍZ AUGUSTO DO AMARAL
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. FLÁVIA MARIA ESTEVES MACHADO
Departamento de Medicina Veterinária / UNIUBE - Uberaba/MG


Prof. Dr. RAUL JOSÉ SILVA GIRIO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 20 de outubro de 2017

Senhor, tu me sondas e me conheces.

Sabes quando me sento e quando me levanto; de longe percebes os meus pensamentos.
Sabes muito bem quando trabalho e quando descanso; todos os meus caminhos te são bem conhecidos.

Antes mesmo que a palavra me chegue à língua, tu já a conheces inteiramente, Senhor.

Tu me cercas, por trás e pela frente, e pões a tua mão sobre mim.
Tal conhecimento é maravilhoso demais e está além do meu alcance, é tão elevado que não
o posso atingir.

(Salmos 139:1-10)

Dedico

Aos meus pais, Renato e Analice, à minha irmã, Iara,
e ao meu sobrinho Miguel

AGRADECIMENTOS

A Deus, aquele que está comigo em todos os momentos, me ensinando, acalmando e dando sabedoria, nas adversidades mostrando os caminhos a serem percorridos, nunca deixando faltar nada, sendo meu refúgio e minha fortaleza.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Mathias, pelas orientações científicas e pessoais, pelos ensinamentos, pela ajuda, pela compreensão, pela atenção, pela confiança, por ser um exemplo de profissional!

À Profa. Dra. Danila Fernanda Rodrigues Frias, por se mostrar disposta a ajudar em todas fases deste projeto, por ser sempre tão gentil e prestativa.

À Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima, minha iniciadora no mundo científico, a primeira a despertar em mim o interesse pela área acadêmica. Obrigada pelos conselhos valiosos, pela amizade, pela força pessoal e técnica.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, pela doação das estirpes autóctones, pelas sugestões, pelas ideias e principalmente pela atenção dispensada em todos os momentos em que precisamos.

Ao técnico Nivaldo Aparecido de Assis, por todo carinho e dedicação na realização de todos os trabalhos executados no laboratório, foi meu parceiro do estágio supervisionado até o último dia de análise das amostras deste trabalho. Sempre com sorriso no rosto disposto a ajudar.

À Glaucenyra, pessoa fundamental nesta jornada e em vários momentos da minha vida. Quantas ajudas prestadas, ideias trocadas e confidências. Vivemos juntas esse grande caminho e isso nos deixou marcas. Minha grande amiga, minha grande dupla!



Às minhas companheiras da República do Pequi (Glaucenyra, Danielle e Marília), por toda amizade, companheirismo, ensinamentos, trocas de experiências acadêmicas e pessoais. Compartilhamos momentos que, certamente, jamais serão esquecidos.

Aos meus colegas de laboratório (Glaucenyra, Thalita Blankenheim, Talita Ribeiro, Carla, José Roberto, Rafael, Felipe e Gian), pela boa convivência, pelas trocas de experiências e por tornarem os dias de trabalho muito mais leves.

Aos meus amigos de pós-graduação (André, Heloísa, Raquel, Danielle, Denise, Roberta, Carolina Dal Farra, Vanda, Gustavo), que tornaram a minha família em Jaboticabal, com quem não só dividi conhecimentos, como também momentos de muitas alegrias, angústias e conquistas durante nossa maravilhosa convivência.

À Unesp, em especial aos docentes e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelos ensinamentos valiosos e pela atenção dispensada no decorrer da pós-graduação. Obrigada por ser aluna desse programa e poder fazer parte dessa família!

A todos os estagiários e residentes que ajudaram na realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À minha família, por sonharem junto comigo, pelo estímulo, pela compreensão, pelas renúncias e pela paciência. Meu estímulo diário.

Por fim, mas não por último, aos meus pais. Sem eles com certeza não seria possível a realização de mais esta etapa, e desta forma, não teria conhecido as pessoas citadas acima nem vivenciado todos estes momentos também. Obrigada por estarem juntos comigo em mais esta etapa, obrigada pela compreensão, carinho, apoio, companheirismo e por não me deixarem desistir dos meus objetivos.

Obrigada a todos por participarem desta etapa da minha vida, pois direta ou indiretamente me fizeram crescer, tanto pessoalmente como profissionalmente.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE QUADROS	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Distribuição da Leptospirose Bovina no Brasil.....	08
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Local do estudo.....	16
4.2. Animais	17
4.3. Análises laboratoriais	19
4.3.1. Teste de soroaglutinação microscópica (MAT).....	19
4.3.2. Isolamento de <i>Leptospira</i> spp.	21
4.3.3. Análise estatística	22
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Frequência de reagentes a <i>Leptospira</i> spp. e sorovares prevalentes	22
5.2. Frequência de reagentes a <i>Leptospira</i> entre as fêmeas e os machos	30
5.3. Isolamento	31
5.4. Coleção de antígenos de referência versus coleção de antígenos com adição de estirpes de leptospira isoladas no Brasil	31
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÕES.....	48
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS.....	51

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 016626/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Infeção por *Leptospira ssp.* Em 10 rebanhos bovinos de corte no estado de Mato Grosso do Sul**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Antonio Mathias está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de setembro de 2014.

Jaboticabal, 03 de setembro de 2014.



Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

CARACTERIZAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO POR *Leptospira* spp. EM REBANHOS BOVINOS DE CORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL

RESUMO – Objetivou-se investigar as características epidemiológicas da leptospirose em bovinos e em rebanhos de corte em um dos principais estados pecuaristas brasileiros, Mato Grosso do Sul, de modo a determinar a frequência, as sorovariedades presentes, os fatores de risco associados à infecção pela *Leptospira* spp., isolar cepas de *Leptospira* de urina de bovinos de corte e, além disso, comparar os resultados obtidos utilizando a coleção de antígenos de referência com aqueles obtidos usando a coleção de antígenos de estirpes de leptospiros isoladas no Brasil. Para isso, foram analisadas 4.629 amostras de soro sanguíneo de bovinos de corte, machos e fêmeas, de diferentes idades, de 10 rebanhos, as quais foram testadas contra uma coleção de 33 sorovariedades de *Leptospira*. Para isolamento, as amostras de urina foram provenientes de animais de cinco rebanhos, totalizando 182 amostras. Inicialmente as amostras de soro sanguíneo foram submetidas à prova de Soroaglutinação Microscópica (MAT) para o diagnóstico sorológico da leptospirose, adotando-se como ponto de corte o título ≥ 100 , e posteriormente foram coletadas amostras de urina dos bovinos para isolamento de *Leptospira*. Observou-se que, dos 4.629 animais avaliados pelo teste de MAT, foram observados 3.814 (82,39%) sororreagentes a pelo menos uma das 33 sorovariedades utilizadas de *Leptospira* spp., com título igual ou acima de 1:100 a uma ou mais sorovariedade de leptospira. Os sorovares mais prováveis de infecção foram: Wolffi 36,49% (905/2480), Shermani 18,43% (457/2480) e Hebdomadis 8,66% (215/2480). A frequência de reagentes entre as fêmeas foi maior que entre os machos. Não se isolou o microrganismo dos animais de nenhum dos cinco rebanhos. Quando realizada a comparação utilizando a coleção de antígenos de referência com a coleção de antígenos de estirpes de leptospiros isoladas no Brasil, houve aumento de 1,23% (57 amostras) na positividade na MAT. Nesse sentido, observou-se alta frequência de animais reagentes, demonstrando a relevância da infecção pelo agente etiológico no Estado; logo, medidas gerais e específicas devem ser implementadas de modo a conter e/ou prevenir a infecção nos animais dessa região.

Palavras-chave: Leptospirose, bovinocultura de corte, Soroaglutinação Microscópica (MAT), estirpes brasileiras.

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *Leptospira* spp. INFECTION IN BEEF CATTLE HERDS FROM THE MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL

ABSTRACT -This study investigated the epidemiological characteristics of bovine leptospirosis in animals and herds in Mato Grosso do Sul, the state with one of the largest herds in Brazil, to determine the frequency, the serovars present in the beef cattle herds, and the risk factors associated with *Leptospira* spp., isolate *Leptospira* strains from the urine of beef cattle, and compare the serology results of this study to a collection of reference antigens. A total of 4,629 serum samples were collected from male and female animals of different ages, from 10 different herds, and tested against 33 *Leptospira* serovars. Initially, the serum samples were submitted to the Microscopic Agglutination Test (MAT) for the serological diagnosis of leptospirosis, the cut-off point ≥ 100 , and subsequently, urine samples, totaling 182, were collected from animals in five herds for isolation of *Leptospira*. The MAT results showed that of the 4,629 animals evaluated, 3,814 (82.39%) were seroreactive to at least one of the 33 *Leptospira* spp. serovars used, with a titer equal to or greater than 1:100 to one or more *Leptospira* serovars. The most prevalent serovars were Wolffi 36.49% (905/2,480), Shermani 18.43% (457/2,480) and Hebdomadis 8.66% (215/2,480). The frequency of reactive animals was higher among females compared to males. The microorganism was not successfully isolated from the animals of any of the five herds. The comparison between the collection of reference antigens and the leptospire strains found in Brazil showed an increase of 1.23% (57 samples) in the MAT positivity. The observed high frequency of reactive animals demonstrates the relevance of the infection by the etiological agent in the state and, therefore, general and specific measures should be implemented to contain and/or prevent infection of the animals in the studied region.

Keywords: Leptospirosis, beef cattle, Microscopic Agglutination Test (MAT), Brazilian strains.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Frequência (nº e %) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes, no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) utilizando 33 antígenos, a pelo menos uma sorovariedade <i>Leptospira</i> spp., de acordo com o rebanho, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	23
Tabela 2. Frequência (nº e %) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes, no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) utilizando 33 antígenos, a pelo menos uma sorovariedade <i>Leptospira</i> spp., de acordo com o município, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	24
Tabela 3. Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	27
Tabela 4. Sorovariedade mais provável de infecção, número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes por rebanho, no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, de acordo com o rebanho, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	28
Tabela 5. Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, de acordo com o sorogrupo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	30
Tabela 6. Resultado, conforme o número (nº) e a frequência (%), do teste de soroaglutinação (MAT), de acordo com o sexo dos bovinos reagentes a pelo menos uma sorovariedade de <i>Leptospira</i> spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	31

Tabela 7.	Reagentes e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, de acordo com o rebanho, com a coleção de 24 sorovariedades e a de 33 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	32
Tabela 8.	Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção, utilizando a coleção de 24 sorovariedades e a de 33 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	35
Tabela 9.	Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando 24 antígenos de referência, de acordo com o sorogrupo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	36
Tabela 10.	Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando 33 sorovariedades, de acordo com o sorogrupo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	38



LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa do Estado de Mato Grosso do Sul destacando as mesorregiões e os municípios onde estão localizados os rebanhos examinados.....	17
Figura 2. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes a pelo menos uma sorovariedade de <i>Leptospira</i> spp., no teste de soraglutinação microscópica (MAT), utilizado 33 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., de acordo com o município, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	24
Figura 3. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soraglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, levando-se em consideração as nove estirpes autóctones isoladas no Brasil, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	25
Figura 4. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soraglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	26
Figura 5. Número de reações às sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. para cada título de aglutininas no teste de soraglutinação microscópica, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	29
Figura 6. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soraglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando a coleção de 24 sorovariedades e a de 33 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	33
Figura 7. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soraglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção, utilizando a coleção de 24 sorovariedades e a de 33 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014.....	34

- Figura 8. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizado 24 antígenos de referência, de acordo com o sorogrupo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014..... 37
- Figura 9. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando 33 sorovariedades, de acordo com o sorogrupo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014..... 39

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Rebanhos examinados e seus respectivos municípios, mesorregiões, raças, vacinação para leptospirose e o número de amostras (nº) de sangue coletadas.....	18
Quadro 2. Estirpes de leptospiras isoladas no Brasil empregadas na soroaglutinação microscópica (MAT) aplicada à leptospirose, segundo o sorogrupo, sorovariedade, Estado (UF) de origem e espécie animal	20
Quadro 3. Coleção de antígenos de referência empregados na soroaglutinação microscópica (MAT) aplicada à leptospirose, segundo o sorogrupo e a sorovariedade.	21

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte assume um papel de grande importância na economia brasileira, já que o país possui o maior rebanho comercial do mundo e é o maior exportador de carne bovina (IBGE, 2015). A busca por maior produtividade pode propiciar, devido às maiores aglomerações, condições epidemiológicas mais favoráveis para a manutenção de agentes patogênicos e maior facilidade de transmissão de patógenos como a *Leptospira* spp.

O efetivo de bovinos no Brasil, em 2015, era de 215,20 milhões de cabeças, e a região Centro-Oeste apresentava o maior número de bovinos entre as regiões, com 33,8% da participação nacional. O Estado de Mato Grosso do Sul possui o quarto maior efetivo bovino do país, ficando atrás de Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás. É uma região com grandes propriedades destinadas à criação de bovinos e com produtores especializados, possuindo clima, relevo e solo favoráveis à atividade (IBGE, 2015).

Sabe-se que as doenças infecciosas podem afetar profundamente os aspectos produtivos, nas diversas regiões, e entre as enfermidades de caráter infeccioso destaca-se a leptospirose. A disseminação de bactérias do gênero *Leptospira* em bovinos é caracterizada principalmente pela existência de animais assintomáticos que podem eliminar o microrganismo por períodos variáveis pela urina, mantendo a doença endêmica nas propriedades (GENOVEZ, 2016).

Em bovinos, a doença está principalmente relacionada a problemas reprodutivos como nascimento de animais fracos, natimortos e abortos (OLIVEIRA et al., 2010). As perdas econômicas causadas pela leptospirose estão ligadas principalmente a essas causas, que podem resultar em queda da produção de carne e leite, além de custos com despesas de assistência veterinária, vacinação e análises laboratoriais (FAINE, 1993).

As sorovariedades que merecem destaque na espécie bovina são Hardjo, Wolffi, Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae. Hardjo e Wolffi pertencem ao mesmo sorogrupo e são descritas como as mais frequentes na espécie bovina, porém no Brasil, apesar de a sorovariedade Wolffi ser encontrada com frequência por sorologia, a mesma só foi isolada em roedores silvestres (*Akodon arviculoides*),

em humanos e em camundongos (*Mus musculus*) (CORREA et al., 1965/1967; GIORGI et al., 1984).

No Brasil, já se isolaram de bovinos os seguintes sorovares: Pomona (FREITAS et al., 1957), Icterohaemorrhagiae (SANTA ROSA et al., 1961), Goiano (YANAGUITA, 1972), Guaicurus (SANTA ROSA et al., 1980), Hardjo e Georgia (MORAIS, 1994), Canicola (ZACARIAS et al., 2008; SILVA, 2014), Copenhageni (ZACARIAS et al., 2008), Panama (MARTINS et al., 2014; MORENO et al., 2015) e estirpes do sorogrupo Autumnalis (MARTINS et al., 2014). O isolamento de *Leptospira* spp. em rebanho com bovinos infectados, além de ser o diagnóstico de confirmação da infecção, com certeza é um passo muito importante para a implementação de programas de controle da enfermidade, já que possibilita a inclusão de sorovariedades autóctones nas vacinas e no teste diagnóstico de soroaglutinação (CASTRO et al., 2008; SARMENTO et al., 2012).

Visto que a leptospirose é uma doença que acomete diversas espécies, causando perdas econômicas devido aos problemas reprodutivos, é importante que se faça a investigação sorológica da doença nesses animais bem como o isolamento do agente etiológico, para caracterizar os animais portadores e indicar as principais medidas de tratamento e controle da enfermidade (VASCONCELLOS et al., 1997; CASTRO et al., 2008; SARMENTO et al., 2012).

Desta forma, considerando-se o efetivo bovino do Estado de Mato Grosso do Sul e as perdas reprodutivas que podem ocorrer devido à infecção pela *Leptospira* spp., é importante o conhecimento da ocorrência e distribuição espacial da doença nos rebanhos do Estado, uma vez que, por meio da informação das sorovariedades presentes e da sua distribuição espacial, é possível adotar medidas de prevenção e controle direcionadas para as sorovariedades predominantes.

Assim, diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar as características epidemiológicas da leptospirose bovina em animais e em rebanhos de um dos principais estados pecuaristas brasileiros, o Estado de Mato Grosso do Sul, e consequentemente determinar a frequência de reagentes a *Leptospira* spp. e os sorovares mais relacionados à infecção em bovinos do Estado, verificar se existe relação entre a frequência da infecção e o sexo dos animais, isolar estirpes de *Leptospira* de urina de bovinos de corte deste Estado e por fim confrontar os

resultados obtidos utilizando a coleção de antígenos de referência com os resultados utilizando a coleção de antígenos com estirpes de leptospiros isoladas no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose trata-se de uma zoonose de etiologia bacteriana, de ocorrência mundial, que pode acometer diversas espécies de animais domésticos, selvagens e acidentalmente os humanos, sendo sua característica epidemiológica associada a condições socioeconômicas (BRASIL, 1995; COLEMAN, 2000; ACHA; SZYFRES, 2001; GENOVEZ, 2016).

As bactérias do gênero *Leptospira* pertencem à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Por muitos anos as bactérias pertencentes a este gênero foi classificada, em sorogrupos e sorovares, com base em determinantes antigênicos, subdivididas em *Leptospira interrogans* (patogênicas) e *Leptospira biflexa* (saprófitas) (PAES, 2016). Atualmente, a classificação é baseada em determinantes genéticos, sendo subdivididas em 20 genomoespécies, classificadas em: patogênicas (*Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira kmetyi*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* e *Leptospira pomona*), oportunistas/intermediárias (*Leptospira inadai*, *Leptospira fainei*, *Leptospira broomii*, *Leptospira licerasiae* e *Leptospira wolffi*) e não patogênicas (*Leptospira biflexa*, *Leptospira meyeri* e *Leptospira wolbachii*) (GENOVEZ, 2016; PAES, 2016).

A infecção pode ser determinada pelas espécies animais de contato, pelo(s) sorovar(es) existente(es) naquela propriedade ou região, pelas condições ambientais e climáticas, e ainda depende do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta (GENOVEZ et al., 2016).

A doença ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais, e desta forma a *Leptospira* spp. é amplamente difundida no Brasil, uma vez que as condições climáticas no país favorecem a disseminação do agente etiológico, adquirida principalmente pelo contato com água contaminada por urina de animais infectados (BRASIL, 1995). Em temperatura ambiental elevada, associada à presença de matéria orgânica, essas bactérias podem sobreviver durante semanas a meses em lagoas, rios, superfícies d'água, solos úmidos e lamas (HENRY; JOHNSON, 1978). Em água limpa o microrganismo pode permanecer viável por até

152 dias, mas não tolera alta salinidade, dessecação, pH ácido e a competição bacteriana em meios muito contaminados (SMITH; TURNER, 1961; GENOVEZ, 2009).

Além da transmissão pelo contato com água contaminada, outras formas de transmissão ocorrem nos animais, por meio do contato com sangue ou fluidos corpóreos de animais infectados, inseminação artificial, além do contato direto com portadores genitais, sendo uma importante rota de transmissão entre animais, e que desempenha importante papel na manutenção da leptospirose dentro de uma mesma espécie (SLEIGHE; WILLIAMS, 1961; KIKTENKO; SBALASHOV; RODINA, 1976; THIERMANN, 1984; FAINE, 1993). As leptospirosas podem invadir o organismo por soluções de continuidade na pele e possivelmente através da pele íntegra, pela conjuntiva, pelas vias aéreas, pelo trato genital (FAINE, 1993).

Nos animais de produção, o estabelecimento da infecção se deve, normalmente, ao livre acesso às águas de superfície contaminadas, em que coabitam outras espécies domésticas ou silvestres, à introdução de animais doentes ou portadores renais e genitais no plantel, ao manejo consorciado de espécies domésticas e, eventualmente, ao trânsito de animais em feiras e exposições (GENOVEZ et al., 2011; GENOVEZ, 2016).

A doença é amplamente difundida e acarreta elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional (VASCONCELLOS, 1993). Em bovinos, a leptospirose é uma importante causa de distúrbios reprodutivos (ELLIS, 1994). A forma aguda da doença em bovinos apresenta severidade dos sinais clínicos de acordo com o sorovar infectante, sendo particularmente grave quando os animais são infectados pelas sorovariedades *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa* e *Pomona*, podendo causar febre alta, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão pulmonar e algumas vezes meningite e morte. A forma crônica normalmente está associada a sorovares pertencentes ao sorogrupo Sejroe (Hardjo e Wolffi), que podem ocasionar aborto, nascimento de animais fracos, natimortos, nascimento de prematuro e bezerras fracos ou aparentemente normais (FAINE, 1993).

Teoricamente qualquer sorovar de *Leptospira* spp. pode infectar qualquer espécie animal, mas na prática um número limitado de sorovares é endêmico em uma região ou país em particular. Neste caso, a infecção é determinada pelas

espécies animais de contato, pelo(s) sorovar(es) existente(es) naquela propriedade ou região, pelas condições ambientais e climáticas, e ainda depende do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta (GENOVEZ et al., 2016).

As diversas sorovariedades possuem hospedeiros de manutenção e hospedeiros acidentais ou incidentais, sendo susceptíveis bovinos, suínos (AGUIAR et al., 2006a), equinos (CHIARELI et al., 2008; SANTOS et al., 2016), cães (AGUIAR et al., 2007), ovinos (MACHADO et al., 2016), caprinos (FAVERO et al., 2001; FAVERO et al., 2002; LILENBAUM et al., 2009) e animais silvestres (LINS; LOPES, 1984; ITO et al., 1998; MARVULO et al., 2002; DE PAULA, 2003; GIRIO et al., 2004; ESTEVES et al., 2005; AHMED et al., 2006; SILVA et al., 2009; VIEIRA, 2009; VIEIRA et al., 2011; LENHARO; SANTIAGO; LUCHEIS, 2012; VIEIRA et al., 2013; MIRANDA et al., 2014). Os reservatórios, na maioria dos casos, são os roedores das espécies *Mus musculus*, *Rattus rattus* e, principalmente, *Rattus norvegicus* (LINS; SANTA ROSA, 1976; SULZER; POPE; ROGERS, 1982; LANGONI, 1999).

Desta forma, sabe-se que os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção da sorovariedade Hardjo, pois possui elevada suscetibilidade à infecção, a transmissão é endêmica entre os animais dessa espécie (CHIARELI et al., 2012). Assim, as infecções pelo sorovar Hardjo podem determinar infertilidade, abortamentos, natimortos, nascimento de animais prematuros, bezerros fracos ou aparentemente normais (mas infectados) e portadores renais (GENOVEZ, 2016). Loureiro et al. (2016) reforçam que, embora seja claro que as principais sorovariedades que acometem os bovinos sejam pertencentes ao sorogrupo Sejroe, sabe-se que nesse sorogrupo ainda existem outras sorovariedades de leptospiros, sugerindo dessa forma a possibilidade de não só a sorovariedade Hardjo, mas também de que outros membros do sorogrupo possam infectar os rebanhos.

Além da sorovariedade Hardjo, outras são envolvidas em infecção nos rebanhos brasileiros e são detectadas com certa frequência em provas sorológicas como: Hardjo, Wolffi, Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae (ELLIS, 1994; FAVERO et al., 2001; GENOVEZ, 2016). As estirpes já isoladas no Brasil foram: Pomona (FREITAS et al., 1957), Icterohaemorrhagiae (SANTA ROSA et al., 1961), Goiano (YANAGUITA, 1972), Guaicurus (SANTA ROSA et al., 1980), Hardjo e Georgia (MORAIS, 1994), Canicola (ZACARIAS et al., 2008; SILVA, 2014),

Copenhageni (ZACARIAS et al., 2008), Panama (MARTINS et al., 2014; MORENO et al., 2015) e estirpes do sorogrupo Autumnalis (MARTINS et al., 2014).

Nesse sentido, conhecer a sorovariedade infectante pode ser importante para reconhecer a epidemiologia da doença na população e determinar as medidas preventivas, uma vez que a resposta imunológica é restrita às sorovariedades antigenicamente relacionadas (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

O diagnóstico conclusivo da infecção por *Leptospira* spp. depende de confirmação laboratorial, uma vez que os sinais clínicos não são específicos, e a enfermidade não apresenta sinais patognomônicos (FAINE, 1993; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). O isolamento de estirpes locais é essencial para o sucesso dos programas de controle e prevenção (TABATA, 2002; LOUREIRO et al., 2015), porém o exame sorológico através do teste de soroaglutinação microscópica (MAT), utilizando antígenos vivos, ainda é o recurso mais amplamente utilizado, sendo a técnica padrão-ouro, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2001). Existem algumas particularidades, no MAT, em relação à coleção de antígenos utilizada, do ponto de corte da reação, além da localização geográfica onde as amostras foram coletadas (FAINE, 1982).

Visto que o teste de soroaglutinação microscópica é o mais utilizado, Castro et al. (2008) ressaltaram a importância da abrangência de sorovariedades antigênicas utilizadas, referindo que desta forma podem ser percebidas as mudanças ou flutuações nos perfis sorológicos de uma população, região ou mesmo país, enfatizando a importância do isolamento de novas estirpes para a inserção na coleção de antígenos utilizados no MAT. Desta forma, Pinto et al. (2015), Sarmiento et al. (2012) e Brod et al. (2005) observaram tal importância, uma vez que houve aumento no número de animais reagentes quando adicionadas estirpes isoladas localmente na coleção de antígenos. Pinto et al. (2015), quando analisaram amostras de 314 animais provenientes de matadouro-frigorífico localizado no Estado do Rio de Janeiro, frente a uma coleção de 21 antígenos de referência, observaram que 173 (55,1%) foram sororreativos a pelo menos um sorogrupo, e quando adicionaram 12 estirpes locais, 204 (65,0%) animais foram sororreagentes, com aumento de 9,9% de sororreatividade.

Sarmiento et al. (2012) também observaram aumento na frequência de animais sororreagentes ao analisarem soro sanguíneo de 9.820 bovinos de várias regiões do Brasil; observaram 5.806 (59,12%) reagentes no MAT a pelo menos um sorovar com a coleção de 23 sorovares de referência, e quando acrescidas na coleção de antígenos dez estirpes autóctones houve 6.400 (65,17%) reagentes. O sorovar mais provável de infecção, quando utilizada a coleção de antígenos de referência e quando ampliada com dez estirpes isoladas no Brasil, foi Hardjo, com frequência de 43,03% e 31,00%, respectivamente.

Brod et al. (2005), ao analisarem 105 amostras de soro sanguíneo de cães, pela MAT, observaram 55 amostras reagentes na coleção de rotina no diagnóstico. E quando inserida como antígeno uma estirpe isolada localmente (sorovar Tande), observaram que o número de positivos aumentou para 75 animais.

Herrmann et al. (2004) utilizaram duas variantes da sorovariedade Hardjo, uma considerada padrão, Hardjoprajitno, e uma amostra Hardjo (Norma) isolada por Moraes (1994) de bovinos do Estado de Minas Gerais. Os autores observaram que dos 233 animais reagentes à sorovariedade Hardjo, 110 (8,09%) reagiram só à variante (Norma), 23 (1,69%) só à Hardjoprajitno e 100 (7,35%) às duas variantes concomitantemente.

2.1. Distribuição da Leptospirose Bovina no Brasil

A leptospira tem sido detectada em praticamente todos os países que realizam investigações epidemiológicas e está mundialmente distribuída (LEVETT, 2001). No Brasil, já foram registradas aglutinações contra vários sorovares de *Leptospira* spp. Em bovinos, diversos são os estudos que relatam a ocorrência da infecção, e a doença só não foi descrita, nos anos 2000, em bovinos do Acre, Amapá, Roraima, Sergipe.

Em trabalho realizado por Favero et al. (2001) foram analisadas amostras provenientes de quatro municípios do Estado de Alagoas, e 100% dos rebanhos e municípios analisados foram positivos para pelo menos uma variante sorológica no teste de soroaglutinação microscópica, e em relação aos animais analisados 59,4%

(59/101) foram reagentes a pelo menos uma sorovariedade de *Leptospira*, sendo as sorovariedades prováveis de infecção a Hardjo (55,5%) e a Wolffi (11,1%).

Homem et al. (2001) realizaram estudo da soroprevalência da leptospirose em bovinos e humanos em 67 propriedades familiares na região de fronteira agrícola da rodovia Transamazônica, na Amazônia Oriental, Estado do Amazonas. Os autores verificaram que a prevalência da leptospirose bovina foi de 97% das propriedades, e em 61,2% dos rebanhos o sorovar Hardjo foi apontado como o mais provável de infecção, em 9% deles o sorovar Bratislava e em 4,5% o Shermani.

Na Bahia foi realizada investigação de leptospirose bovina por Oliveira et al. (2010), e das 1.414 propriedades investigadas, 1.076 (77,9%) apresentaram pelo menos um animal reagente, no MAT, a algum sorovar. O sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) foi o mais prevalente, com 34,49% das propriedades com animais positivos.

No Estado do Ceará, foi realizado estudo com amostras provenientes de oito municípios, 87,5% dos municípios apresentaram amostras reagentes, 90,5% dos rebanhos apresentaram animais reagentes a pelo menos uma sorovariedade de *Leptospira* spp., sendo as sorovariedades prováveis de infecção a Hardjo (33,3%) e a Wolffi (22,3%) (FAVERO et al., 2001).

No Estado de Espírito Santo, Viana et al. (2010) coletaram 330 amostras de soro bovino provenientes de 55 propriedades rurais da Bacia leiteira do Caparaó, e encontraram a frequência de 12,42% (41) de animais reagentes a pelo menos um sorovar testado. O sorovar Hardjobovis apresentou-se como o mais frequente entre os soros reagentes, com 41 (12,42%) amostras, seguido de Hardjo amostra Bolívia, com 32 (9,69%).

No Estado de Goiás, foram analisadas 140 amostras da microrregião de Goiânia (MG), por Campos Júnior et al. (2006), referentes a 60 propriedades. A prevalência de sororreagentes foi 74,28% e os sorovares mais prevalentes foram: Wolffi (19,23%) e Hardjo (15,38%). No trabalho de Juliano et al. (2000) foram colhidas 426 amostras de soro de bovinos, provenientes de vacas em lactação na microrregião de Goiânia-GO, e testadas pelo método de soroaglutinação microscópica (MAT), e os resultados obtidos revelaram uma prevalência de 81,90% de animais reagentes. Os principais sorovares envolvidos foram: Wolffi (36,10%),

Icterohaemorrhagiae (20,50%), Hardjo (5,20%) e Tarassovi (4,90%). Mais recentemente, Juliano et al. (2016) avaliaram propriedade de bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro em 10 propriedades do Estado de Goiás, e dos animais analisados, 200 (39,52%) foram sororreagentes a pelo menos uma sorovariedade de leptospira no MAT. Os sorovares mais frequentes foram Hardjo, Wolfii, Grippotyphosa, Shermani e Hebdomadis.

Silva et al. (2012), com o objetivo de estudar as características epidemiológicas da leptospirose bovina, analisaram, pela técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), amostras de soro provenientes de 4.832 fêmeas bovinas do Estado do Maranhão (MA), e destas 1.904 (35,94%) foram reagentes. Das 573 propriedades analisadas, 380 (64,81%) tiveram animais reagentes, e as sorovariiedades Hardjo e Wolffi foram as mais frequentes em todo o Estado. Outro estudo foi realizado por Coelho et al. (2014), com o objetivo de determinar a prevalência de leptospirose em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos no município de São Luís, MA; das 100 amostras de soro analisadas, 64% foram positivas no MAT. Dos 24 sorovares testados, os mais frequentes foram: Hardjo, Grippotyphosa e Wolffi.

Em relação ao Estado de Mato Grosso, no estudo de Favero et al. (2001) foram analisadas amostras de 237 animais, sendo a frequência encontrada de amostras sororreagentes de 62,5% (148/237), 100% dos municípios apresentaram pelo menos uma amostra positiva no MAT, e 94,4% dos rebanhos foram reagentes a pelo menos uma variante sorológica, sendo a Hardjo e a Wolffi as sorovariiedades mais prováveis de infecção. Outro estudo foi conduzido neste estado por Pellegrin et al. (1999), com o objetivo de estimar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* em bovinos adultos do Pantanal Mato-grossense. Foram analisadas amostras de 756 machos e fêmeas provenientes de 28 rebanhos. A prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. contra pelo menos uma das sorovariiedades testadas foi de 38,88% (294), a frequência de animais reagentes nas propriedades estudadas variou de 10 a 84%, e foram encontrados animais reagentes em todas as propriedades estudadas.

No Estado de Mato Grosso do Sul, Favero et al. (2001) analisaram amostras provenientes de 882 animais, sendo a frequência encontrada de amostras

sororreagentes de 62,3% (550/882), 100% dos municípios e rebanhos apresentaram pelo menos um animal positivo no MAT, Hardjo e Wolffi foram as sorovariedades mais prováveis de infecção. Outro trabalho foi realizado por Figueiredo et al. (2009), que investigaram a prevalência de anticorpos antileptospira em fêmeas bovinas provenientes de 178 rebanhos de 22 municípios do Estado de Mato Grosso do Sul, e encontraram no MAT títulos iguais ou superiores a 100 contra um ou mais sorovares em 1.801 fêmeas (98,8%) de 161 (96,5%) rebanhos. O sorovar Hardjo (65,6%) foi apontado como o mais provável, seguido do sorovar Wolffi (12,3%).

Em Minas Gerais, Favero et al. (2001) analisaram amostras provenientes de 4.487 animais e encontraram uma frequência de 87,3% de amostras sororreagentes a pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp. e verificaram que 98% dos municípios e 87,3% dos rebanhos apresentaram pelo menos uma amostra positiva no MAT; as sorovariedades Hardjo e Wolffi foram as mais prováveis de infecção nas amostras do estudo. Ainda em relação a esse estado foram analisados os resultados do teste de soroaglutinação microscópica, para pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira interrogans*, em 39.012 soros sanguíneo de bovinos provenientes de 398 municípios, e detectou-se que as sorovariedades mais prováveis de infecção nos rebanhos foram: Hardjo (amostra Norma), Hardjo (OMS), Hardjo (Hardjobovis) e Wolffi (ARAÚJO et al., 2005).

No Estado do Pará, realizou-se pesquisa com amostras de soro sanguíneo, urina e rins de bovinos abatidos no matadouro, provenientes de seis municípios, com o objetivo de verificar a soroprevalência da leptospirose e demonstrar a presença da *Leptospira* spp. Foram analisadas 131 amostras de soro, e destas, 102 (77,8%) mostraram-se positivas sorologicamente a pelo menos um sorovar; todos os rebanhos foram reagentes. O sorovar de maior prevalência nas amostras pesquisadas foi Hebdomadis, com 41,2%, seguido de Hardjo, com 33,6% (NEGRÃO; MOLNÁR; MOLNÁR, 2000).

Na Paraíba, Oliveira et al. (2013), com o objetivo de determinar a frequência de rebanhos e de animais positivos para leptospirose em propriedades rurais de agricultura familiar da mesorregião do Agreste, colheram amostras de sangue de 771 animais procedentes de 130 rebanhos em cinco municípios. Dos 130 rebanhos investigados, 24 (18,4%) apresentaram pelo menos um animal reagente no MAT a

qualquer um dos 24 sorovares de *Leptospira* spp. empregados. O sorovar Hardjo foi o mais frequente, com 29,16% de propriedades positivas, seguido pelo sorovar Patoc (25%). Pimenta et al. (2014) também investigaram rebanhos e animais deste estado, e verificaram que das 450 propriedades investigadas 398 (89,7%) apresentaram pelo menos um animal reagente, no MAT, a qualquer sorovar, e 1.349 (61,1%; IC 95% = 56,6-65,4%) animais foram soropositivos. O sorovar Hardjo foi o mais prevalente nas propriedades e nos animais, com frequências de 58,17% e 54,69%, respectivamente.

No Estado do Paraná, Hashimoto et al. (2010), com o objetivo de determinar a prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos, caninos, equinos, ovinos e suínos, oriundos de 40 propriedades localizadas na área rural do município de Jaguapitã, observaram a prevalência na espécie bovina de 42,43% de animais sororreagentes, no MAT, e o sorovar mais provável encontrado em bovinos foi Hardjo. Outro estudo, conduzido por Hashimoto et al. (2012), teve o objetivo de analisar amostras de 1.880 fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de 274 rebanhos não vacinados contra a *Leptospira* spp, do Estado do Paraná. Dos 274 rebanhos analisados, no MAT, 181 apresentaram pelo menos um animal sororreagente para a *Leptospira* spp., com a prevalência de rebanhos de 66,06%. Hashimoto et al. (2015) também analisaram rebanhos bovinos com atividade reprodutiva com o objetivo de determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. Foram estudadas 14.163 fêmeas com idade ≥ 24 meses, provenientes de 1.926 rebanhos não vacinados contra a leptospirose, e a prevalência aparente de propriedades e animais sororreagentes no estado nesse estudo foi de 54,28% e 37,70%, respectivamente.

Em Pernambuco, Rolim et al. (2013) coletaram 412 amostras sorológicas de bovinos de corte abatidos em matadouro e verificaram que destas amostras testadas para *Leptospira* spp., pelo MAT, 55 (13,3%) foram sororreagentes a pelo menos uma sorovariedade. As sorovariedades mais frequentes foram: Shermani (25,5%), Wolffii (14,5%) e Hebdomadis (10,9%).

No Estado do Piauí, na Microrregião de Parnaíba, Mineiro et al. (2007) realizaram pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em bovinos e verificaram que das 1.975 amostras analisadas, pertinentes a 16 rebanhos, 1.044 (52,9%) mostraram-se

positivas a pelo menos um sorovar, e todos os rebanhos apresentaram animais reagentes. O sorovar de maior prevalência foi Hardjo, reagindo em 39,5%, seguido de Wolffi com 26,7%. Em outra pesquisa conduzida por Mineiro et al. (2010), foi possível verificar, pela pesquisa de sorovares de leptospiros em animais da Bacia Leiteira de Parnaíba, que de 18 vacas testadas pela técnica de soroaglutinação microscópica, 83,33% (15/18) das amostras apresentaram aglutininas anti-leptospira, e o sorovar mais provável de infecção no rebanho foi o Hardjoprajtino, com 53,33% de animais reagentes.

No Rio de Janeiro, Lilenbaum e Souza (2003) analisaram, pelo MAT, amostras de soro de 379 vacas adultas com baixa fertilidade e foram detectados anticorpos em 46,9% dessas vacas, e a sorovariedade provável de infecção foi a Hardjo (43,8%).

Na região Nordeste, no Estado do Rio Grande do Norte, Barrêto Júnior et al. (2005) verificaram a prevalência da leptospirose em bovinos leiteiros do município de Mossoró-RN. Foram analisadas 14 propriedades, e 100% apresentaram pelo menos um animal sororreagente a leptospirose, e das 138 amostras sanguíneas, 82 (59,42%) apresentaram resultados positivos no teste. Os sorovares mais prevalentes foram Hardjo (56,52%), Wolffi (44,9%), Pomona (4,35%) e Icterohaemorrhagiae (0,72%).

No trabalho de Favero et al. (2001) foram analisadas amostras provenientes de 51 municípios do Estado do Rio Grande do Sul, e destes 92,0% apresentaram animais sororreagentes para uma ou mais sorovariedades de leptospira, e a prevalência de rebanhos reagentes foi de 79,3%, entre animais de 28,9% (709/2.551), sendo as sorovariedades prováveis de infecção: Hardjo, Wolffi e Pyrogenes.

Em Rondônia foi investigada a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em 2.109 vacas provenientes de 86 rebanhos do município de Monte Negro. Foram detectados anticorpos anti-*Leptospira* spp. em 1.114 vacas (52,8%) de 82 (95,3%) rebanhos, e os sorovares mais prevalentes foram Hardjo (14,5%) e Wolffi (12,3%) (AGUIAR et al., 2006b).

Tonin et al. (2010) analisaram 3.945 soros de bovinos provenientes do Estado de Santa Catarina e verificaram que 2.585 (65,53%) foram positivos, e na

distribuição por sorovares a Hardjo foi sorologicamente detectada em 1.237 amostras (31,36%).

No Estado de São Paulo, diversos estudos de prevalência foram realizados. Del Fava et al. (2004) analisaram fêmeas bovinas de corte das raças Gir, Guzerá, Nelore e Caracu para *Leptospira* spp., pela técnica de soroaglutinação microscópica, e a ocorrência de fêmeas reagentes com título maior ou igual a 100 foi de 48,3% (344/712), o sorovar predominante foi Hardjo (49,7%). Castro et al. (2008) realizaram a Soroaglutinação Microscópica (MAT) em 8.216 amostras sorológicas de animais provenientes de 1.021 propriedades e observaram soroprevalência de 49,4% nas fêmeas bovinas em idade reprodutiva e em 718 das propriedades analisadas, e o sorovar Hardjo (46%) e sua associação com o sorovar Wolffi (21%) foram prevalentes entre o total de animais sororeagentes. Magajevski; Girio e Meirelles (2007) analisaram amostras de sangue de 212 vacas prenhas colhidas no momento do abate, em um abatedouro do Estado de São Paulo, para investigar a ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. pela prova de soroaglutinação microscópica (MAT), e encontraram 95 (44,81%) amostras sororeagentes a pelo menos um dos 24 sorovares testados, sendo Hardjo (44,7%) e Wolffi (28,5%) os sorovares prováveis de infecção nas amostras coletadas. Em outro estudo em propriedades do estado, Castro et al. (2009) analisaram 8.216 soros de fêmeas bovinas, provenientes de 1.021 propriedades, pela MAT. Dentre as 1.021 propriedades investigadas, 718 apresentaram pelo menos um animal reagente na SAM a algum sorovar, e as sorovariedades mais prevalentes foram Hardjo, com 55,2%, e sua associação com o sorovar Wolffi, com 20,2%. Langoni et al. (2000) analisaram, pelo MAT, 2.761 amostras de soro de bovinos, de várias raças, com idades variáveis entre 6 meses e 10 anos, provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Os resultados revelaram 1.258 (45,56%) amostras positivas, sendo os sorovares prevalentes Wolffi, Hardjo, Pyrogenes e Canicola.

Figueiredo et al. (2009) analisaram 2.573 amostras de soro sanguíneo provenientes do Estado do Tocantins e verificaram na MAT títulos iguais ou superiores a 100 a um ou mais sorovares em 1.801 fêmeas (98,8%) de 161 (96,5%) rebanhos. O sorovar Hardjo (65,6%) foi apontado como o mais provável, seguido do sorovar Wolffi (12,3%).

Segundo Favero et al. (2002), é importante um sistema de vigilância epidemiológica permanente que possibilite o monitoramento da distribuição espacial das sorovariedades de leptospiros presentes nas diferentes regiões, de modo a racionalizar as medidas de controle, com especial destaque para a imunoprofilaxia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Investigar as características epidemiológicas da leptospirose em bovinos e rebanhos de corte localizados no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a frequência de reagentes a *Leptospira* spp. e os sorovares mais relacionados à infecção nos bovinos de 10 rebanhos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil .
- Verificar se existe relação entre a frequência de animais sororreagentes e o sexo dos animais.
- Isolar estirpes de *Leptospira* de urina de bovinos de corte.
- Confrontar os resultados obtidos utilizando a coleção de antígenos de referência com os resultados obtidos utilizando a coleção de antígenos com estirpes de leptospiros isoladas no Brasil

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do estudo

O Estado de Mato Grosso do Sul localiza-se no sul da Região Centro-Oeste. O estado possui o quarto maior (21.357.398) efetivo bovino do país, ficando atrás de

Mato Grosso (29.364.042), Minas Gerais (23.768.959) e Goiás (21.887.720) (IBGE, 2015).

As amostras foram provenientes de animais propriedades localizadas nos municípios de Campo Grande, Miranda, Dois Irmãos do Buriti, Brasilândia, Terenos, Rio Brilhante, Rio Verde de Mato Grosso e Camapuã (Figura 1).

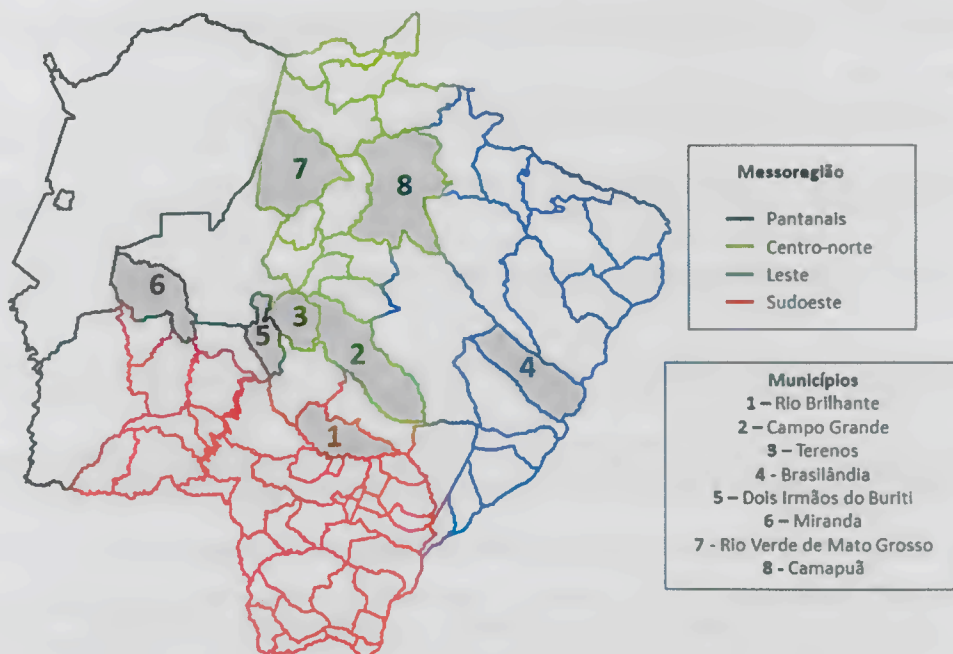


Figura 1. Mapa do Estado de Mato Grosso do Sul destacando as mesorregiões e os municípios onde estão localizados os rebanhos examinados.

4.2. Animais

Foram analisadas 4.629 amostras de soro sanguíneo de bovinos de corte (Nelore Pura Origem, Nelore Comercial, Senepol, Caracu, Leiteira Cruzada e Cruzados), machos e fêmeas, de diferentes idades, de 10 rebanhos (Quadro 1), localizados no Estado de Mato Grosso do Sul. Essas amostras foram resultantes de uma parceria com a EMBRAPA Gado de Corte, localizada em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, e foram coletadas no ano de 2014, para pesquisa de leptospirose e de outras enfermidades de interesse em animais de produção.

A escolha das propriedades foi feita por conveniência, pois participaram da pesquisa as propriedades cujos proprietários autorizaram a coleta de amostras.

Dentro das propriedades foram coletadas amostras de todas as matrizes e de todos os reprodutores.

Quadro 1. Rebanhos examinados e seus respectivos municípios, mesorregiões, raças, vacinação para leptospirose e número de amostras (n°) de sangue coletadas.

Rebanho	Município	Mesorregião	Raça	Vac*	n°
1	Rio Brilhante	Sudoeste	Nelore PO/Cruzada	Não	126
2	Campo Grande	Centro-norte	Nelore Comercial/ Caracu/Senepol/Cruzada	Não	501
3	Campo Grande	Centro-norte	Nelore PO/Cruzada	Sim	535
4	Terenos	Centro-norte	Nelore PO/Nelore Comercial	Não	694
5	Brasilândia	Leste	Nelore Comercial/Cruzada/ Senepol	Não	639
6	Dois Irmãos do Buriti	Pantanaís	Nelore PO	Sim	419
7	Miranda	Pantanaís	Nelore PO	Sim	522
8	Rio Verde de Mato Grosso	Centro-norte	Nelore PO/Nelore Comercial/ Cruzadas	Sim	526
9	Camapuã	Centro-norte	Senepol/ Cruzadas/Leiteira Cruzada	Não	445
10	Miranda	Pantanaís	Nelore PO	**	222
Total					4.629

*Vacinação

** Alguns animais no rebanho são vacinados

O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, onde foi armazenado a uma temperatura de -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos. Para o diagnóstico de leptospirose foi utilizada no teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT).

Para isolamento, a escolha das propriedades foi feita por conveniência, e dessa forma as amostras de urina foram provenientes de animais de cinco propriedades, totalizando 182 amostras. A metodologia de Thiermann (1980), Ellis (1982) e Silva (2014) foi utilizada para realização da tentativa de isolamento. Assim, foram coletadas, por micção espontânea ou estímulo por massagem vulvar, aproximadamente 10 mL de amostra de cada animal, e inoculadas em condições assépticas, logo em seguida, no local de coleta. Após, as amostras de urina foram filtradas, desta forma foi acoplado um filtro de 0,22 µm na extremidade da seringa para que, próximo a uma fonte de calor, fosse depositado, simultaneamente, 0,1 mL

da urina filtrada em um tubo esterilizado contendo meio de cultura semissólido (Fletcher) sem antibiótico e 0,1 mL em um tubo esterilizado contendo meio de cultura líquido (EMJH) sem antibiótico. Esses tubos foram acondicionados em recipientes fechados, transportados até a EMBRAPA Gado de Corte e armazenados no Laboratório de Virologia em estufa BOD até o momento de transporte para o Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, onde as amostras foram avaliadas semanalmente.

4.3 Análises laboratoriais

4.3.1. Teste de soroaglutinação microscópica (MAT)

No Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV, Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, os antígenos de *Leptospira* spp. utilizados nos testes sorológicos foram repicados semanalmente em meio de cultura líquido de EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris), tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear, e mantidos em estufa bacteriológica BOD à temperatura de $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (OIE, 2001).

As amostras de soro sanguíneo foram diluídas em solução salina, sendo a diluição inicial 1/50. Aliquotas de 25 μL foram colocadas em placas de poliestireno, com fundo chato, e adicionada igual quantidade de antígeno, das 33 sorovariedades de *Leptospira* spp. As estirpes isoladas no Brasil utilizadas foram: Guaicurus (GUAL), Goiano (GOI), LO10, LO04, GR6, 2ACAP, Brasilienses (BRAS), 110/06 e LO14 (Quadro 2), cedidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As estirpes de referência utilizadas foram: Andamana (AND), Australis (AUS), Bratislava (BRA), Autumnalis (AUT), Butembo (BUT), Castellonis (CAS), Bataviae (BAT), Canicola (CAN), Whitcombi (WHI), Cynopteri (CYN), Sentot (SEN), Grippotyphosa (GRI),

Hebdomadis (HEB), Copenhageni (COP), Icterohaemorrhagiae (ICT), Javanica (JAV), Panama (PAN), Pomona (POM), Pyrogenes (PYR), Hardjo (HAR), Wolffi (WOL), Patoc (PAT), Shermani (SHE) e Tarassovi (TAR) (Quadro 3).

A mistura soro-antígeno foi levemente homogeneizada e incubada em estufa BOD à temperatura de 28°C por 40 a 120 minutos, procedendo-se a seguir à leitura em microscopia de campo escuro, com objetiva e ocular de 10x, diretamente dos poços da placa. Foram consideradas reagentes aquelas amostras que apresentaram título ≥ 100 . As leituras das placas foram realizadas pelo mesmo indivíduo, com o objetivo de minimizar qualquer viés de interpretação.

Foram consideradas reagentes as amostras em que ocorreram 50% de aglutinação, estando metade das leptospiros aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. As amostras reagentes na diluição inicial foram testadas com diluições seriadas de razão dois, diluídas de 1/100 a 1/800, conforme a recomendação da OIE (2001).

Para observação da prevalência consideraram-se como reagentes os animais reagentes a uma ou mais sorovariedades. Já para a determinação da sorovariedade mais provável foi considerada apenas a sorovariedade de maior título e desconsiderados os animais que obtiveram títulos iguais contra duas ou mais sorovariedades.

Quadro 2. Estirpes de leptospiros isoladas no Brasil empregadas na soroaglutinação microscópica (MAT) aplicada à leptospirose, segundo sorogrupo, sorovariedade, Estado de origem (UF) e espécie animal de origem.

Estirpe	Sorogrupo	Sorovar	UF	Espécie de origem
Guaicurus	Sejroe	Guaricura	MT	<i>Bos taurus</i> (Bovino)
Goiano	Hebdomadis	Goiano	GO	<i>Bos taurus</i> (Bovino)
LO10	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	PR	<i>Bos taurus</i> (Bovino)
LO04	Canicola	Canicola	PR	<i>Sus scrofa</i> (Suíno)
GR6	Pomona	Não identificado	SP	<i>Sus scrofa</i> (Suíno)
2ACAP	Grippotyphosa	Bananal	SP	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (Capivara)
Brasilienses	Bataviae	Brasilienses	SP	<i>Dydelphis marsupialis</i> (Gambá)
M. 110/06	Não identificado	Não identificado	MS	<i>Cercocyon thous</i> (Cachorro-domato)
LO14	Canicola	Canicola	PR	<i>Canis familiaris</i> (Cão)

Quadro 3. Coleção de antígenos de referência empregados na soroaglutinação microscópica (MAT) aplicada à leptospirose, segundo o sorogrupo e a sorovariedade.

Sorogrupo	Sorovariedade
Andamana	Andamana
Australis	Australis
Australis	Bratislava
Autumnalis	Autumnalis
Autumnalis	Butembo
Ballum	Castellonis
Bataviae	Bataviae
Canicola	Canicola
Celledoni	Whitcombi
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Sentot
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohemorrhagiae	Copenhageni
Icterohemorrhagiae	Icterohemorrhagiae
Javanica	Javanica
Panama	Panama
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo
Sejroe	Wolffi
Seramanga	Patoc
Shermani	Shermani
Tarassovi	Tarassovi

4.3.2. Isolamento de *Leptospira* spp.

As culturas contendo a urina dos animais foram avaliadas semanalmente durante um período de 24 semanas. Quando observado o anel de multiplicação, indicando multiplicação, de *Leptospira* spp. em meio Fletcher ou EMJH, a cultura foi repicada em meio EMJH sem antibiótico, e ao mesmo tempo também uma alíquota foi retirada para observação em microscopia de campo escuro com objetiva de 10x, segundo metodologia preconizada por Faine (1993).

4.3.3 Análise estatística

A base de dados e a construção de tabelas e gráficos foram realizadas usando as planilhas eletrônicas do programa Microsoft Excel versão 2010. Cada amostra de soro sanguíneo possuía informação sobre propriedade de origem, sexo, idade e resultados nos testes de soroglutinação microscópica e isolamento.

Foi feita estatística descritiva, com distribuição de frequências e cálculo do intervalo de confiança das taxas de prevalência por rebanho, usando a metodologia recomendada por Thrusfield (2010). Para verificar a diferença nas frequências de animais reagentes por rebanho utilizando 24 ou 33 sorovariedades foi utilizado o teste de Mc Nemar ou o teste binomial, por meio do software R (R CORE TEAM, 2013). A análise da diferença entre as frequências de animais reagentes, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção utilizando a coleção com 24 ou com 33 sorovariedades, foi calculada com base na diferença entre os intervalos de confiança.

Para analisar se a variável 'sexo' estava associada à frequência da infecção, foi feita a análise univariada, com cálculo da razão de prevalência e de seu respectivo intervalo de confiança e teste de χ^2 . Os cálculos foram realizados empregando o software Epi Info 7.

5. RESULTADOS

5.1. Frequência de reagentes a *Leptospira* spp. e sorovares prevalentes

Dos 4.629 animais avaliados pelo teste de MAT, foram observados 3.814 (82,39%) sororreagentes a pelo menos uma das 33 sorovariedades utilizadas de *Leptospira* spp., com título igual ou acima de 1:100 a uma ou mais sorovariedade de leptospira. A prevalência de rebanhos com animais reagentes foi de 100% quando consideradas reações a qualquer das sorovariedades empregadas como antígeno. O rebanho 7, localizado no município de Miranda, foi o que apresentou maior proporção de animais sororreagentes, com 98,66% (515/522), e o rebanho 3, localizado no município de Campo Grande, apresentou a menor proporção de animais reagentes, com 65,61% (351/535) (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência (nº e %) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes, no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) utilizando 33 antígenos, a pelo menos uma sorovariedade *Leptospira* spp., de acordo com o rebanho, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Rebanho	MAT		
	Reagentes*	(%)	IC 95% (%)
1	91/126	72,22	64,40-80,04
2	430/501	85,83	82,77-88,88
3	351/535	65,61	61,58-69,63
4	531/694	76,51	73,36-79,67
5	559/639	87,48	84,91-90,05
6	365/419	87,11	83,90-90,32
7	515/522	98,66	97,26-99,35
8	478/526	90,87	88,41-93,34
9	320/445	71,91	67,73-76,09
10	174/222	78,38	72,96-83,79
Total	3.814/4.629	82,39	81,30-83,49

*Número de animais positivos sobre o número de animais examinados em cada rebanho.

A tabela 2 demonstra a porcentagem de bovinos sororreagentes segundo o município de origem. Observa-se que todos (100%) os oito municípios apresentaram animais sororreagentes contra uma ou mais sorovariedades de leptospira testadas. O município de Miranda foi o que apresentou a maior proporção de animais reagentes, com 92,60% (689/744). O município de Camapuã, com 71,91% (320/445), apresentou o menor número de sororreagentes (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2. Frequência (nº e %) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes, no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) utilizando 33 antígenos, a pelo menos uma sorovariedade *Leptospira* spp., de acordo com o município, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Município	MAT		
	Reagentes*	(%)	IC 95% (%)
Brasilândia	559/639	87,48	84,91-90,05
Camapuã	320/445	71,91	67,73-76,09
Campo Grande	781/1.036	75,39	72,76-78,01
Dois Irmãos do Buriti	365/419	87,11	83,90-90,32
Miranda	689/744	92,60	90,73-94,49
Rio Brilhante	91/126	72,22	64,40-80,04
Rio Verde de M. Grosso	478/526	90,87	88,41-93,34
Terenos	531/694	76,51	73,36-79,67
Total	3.814/4.629	82,39	81,30-83,49

*Número de animais positivos sobre o número de animais examinados em cada município.

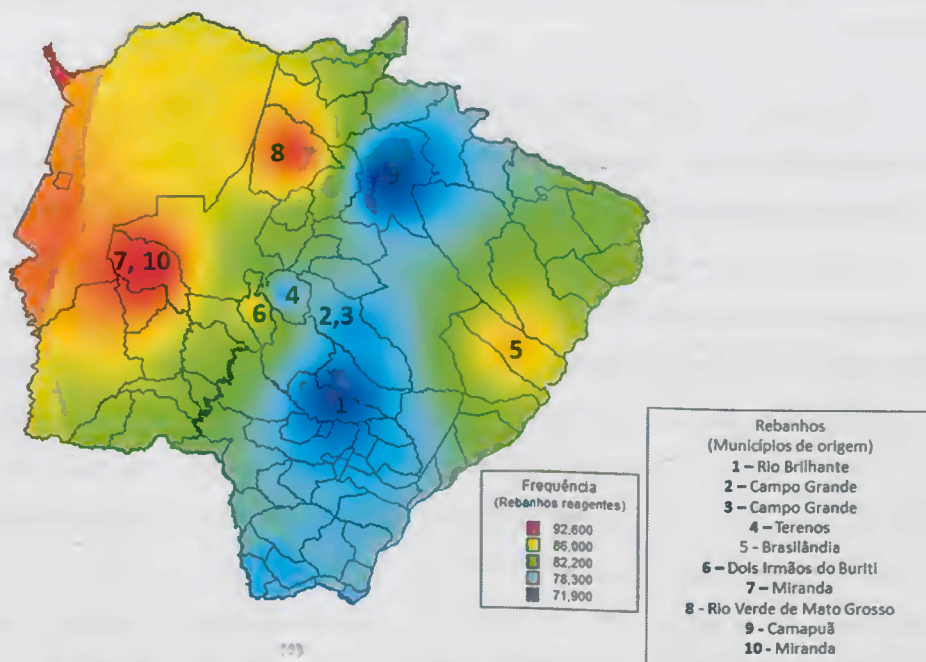


Figura 2. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes a pelo menos uma sorovariedade de *Leptospira* spp., no teste de soroaglutinação microscópica (MAT), utilizado 33 sorovariedades de *Leptospira* spp., de acordo com o município, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Quando levadas em consideração na análise da prova de soroaglutinação microscópica somente as nove estirpes autóctones isoladas no Brasil, desconsiderando as 24 utilizadas na rotina, os municípios com maior frequência de reagentes entre as estirpes autóctones foram Rio Verde de Mato Grosso, com 49,24% (259/526), seguido de: Miranda, com 49,05% (365/744), Campo Grande, com 42,08% (436/1.036), Brasilândia, com 37,40% (239/639), Dois Irmãos do Buriti, com 25,30% (106/419), Rio Brilhante, com 17,46% (22/126), Camapuã, com 15,95% (71/445), e Terenos, com 4,18% (29/694) de animais sororreagentes. Desta forma, a distribuição espacial se encontra na figura 3.

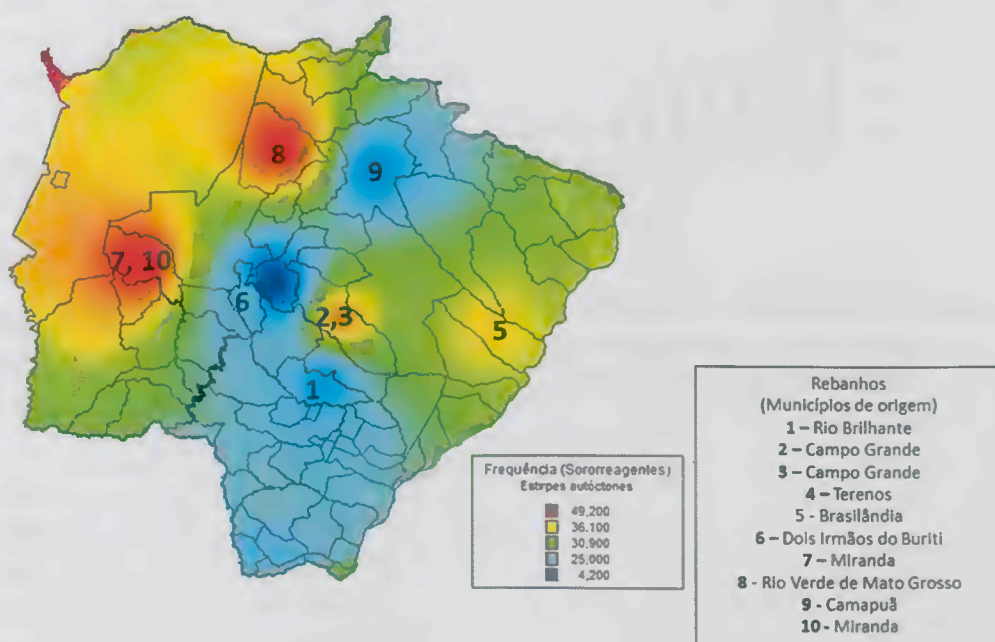


Figura 3. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, levando-se em consideração as nove estirpes autóctones isoladas no Brasil, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Em relação aos sorovares mais prováveis de infecção, sendo assim considerada apenas a sorovariedade de maior título e desconsiderando os animais que obtiveram títulos iguais contra duas ou mais sorovariedades, levando-se em consideração os 33 antígenos analisados, observou-se o predomínio da sorovariedade Wolffi, com frequência de 36,49% (905/2.480), seguida da Shermani,

com 18,43% (457/2.480), e Hebdomadis, com 8,66% (215/2.480) (Tabela 3, Figura 4). Observou-se que, entre as nove estirpes isoladas no Brasil utilizadas, a de maior ocorrência foi a Guaicurus, com frequência de 2,5% (31/2.480), seguida da Goiano, com 1,25% (31/2.480), e LO10, com 0,77% (31/2.480) (Tabela 3).

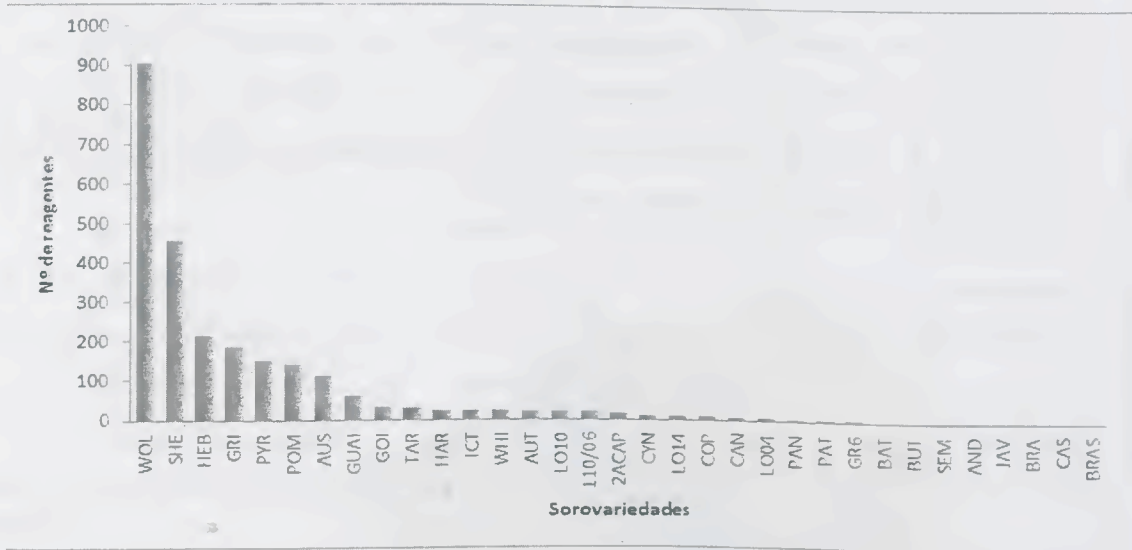


Figura 4. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Tabela 3. Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Sorovar	MAT		IC 95% (%)
	Reagentes*	(%)	
WOL	905/2.480	36,49	34,60-38,39
SHE	457/2.480	18,43	16,90-19,95
HEB	215/2.480	8,66	7,56-9,78
GRI	185/2.480	7,46	6,43-8,49
POM	142/2.480	5,73	4,81-6,64
PYR	151/2.480	6,09	5,15-7,03
AUS	111/2.480	4,48	3,73-5,36
TAR	29/2.480	1,17	0,82-1,67
HAR	24/2.480	0,97	0,65-1,44
ICT	24/2.480	0,97	0,65-1,44
AUT	20/2.480	0,81	0,52-1,24
WHI	22/2.480	0,89	0,59-1,34
CAN	08/2.480	0,32	0,16-0,64
COP	09/2.480	0,36	0,19-0,69
CYN	10/2.480	0,40	0,22-0,74
PAN	03/2.480	0,12	0,04-0,36
BUT	00/2.480	0,00	0,00-0,15
JAV	00/2.480	0,00	0,00-0,15
PAT	01/2.480	0,04	0,01-0,23
BAT	00/2.480	0,00	0,00-0,15
SEN	00/2.480	0,00	0,00-0,15
AND	00/2.480	0,00	0,00-0,15
BRA	00/2.480	0,00	0,00-0,15
CAS	00/2.480	0,00	0,00-0,15
GUA	62/2.480	2,5	1,96-3,19
GOI	31/2.480	1,25	0,88-1,77
LO10	19/2.480	0,77	0,49-1,19
110/06	18/2.480	0,73	0,46-1,14
2ACAP	17/2.480	0,68	0,43-1,10
LO14	10/2.480	0,40	0,22-0,74
LO04	06/2.480	0,24	0,11-0,53
GR6	01/2.480	0,04	0,01-0,23
BRAS	00/2.480	0,00	0,00-0,15
TOTAL	2.480/2.480	100,00	

*Frequência calculada do total de reações aproveitadas, uma vez que, nesta análise, aquelas em que houve empate, título mais alto igual para duas ou mais sorovariedades, foram desconsideradas.

Quando considerado o sorovar mais provável de infecção por rebanho, observou-se que as sorovariedades Wolffi, Shermani, Gripothyphosa, Pyrogenes, Pomona e Australis ocorreram em todos os rebanhos analisados; a sorovariedade Wolffi foi a de maior ocorrência, sendo observada como a mais prevalente em 8 dos 10 rebanhos analisados (Tabela 4) e em dos rebanhos, mesmo não sendo a mais prevalente foi a de segunda maior ocorrência.

Tabela 4. Sorovariedade mais provável de infecção, número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes por rebanho, no teste de soraglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, de acordo com o rebanho, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Rebanho	Sorovariedade	Reagentes*	(%)	IC 95% (%)
1	Wolffi	28/79	35,44	24,89-45,99
	Gripothyphosa	16/79	20,25	11,39-29,12
2	Wolffi	131/303	43,23	37,66-48,81
	Shermani	77/303	25,41	20,51-30,31
3	Wolffi	42/202	20,79	15,20-26,39
	Pyrogenes	39/202	19,31	13,86-24,75
4	Wolffi	176/370	47,57	42,48-52,66
	Shermani	72/370	19,46	15,43-23,49
5	Wolffi	116/355	32,68	27,80-37,55
	Hebdomadis	105/355	29,58	24,83-34,32
6	Wolffi	121/260	46,54	40,47-52,60
	Shermani	52/260	20,00	15,14-24,86
7	Pomona	97/273	35,53	29,85-41,21
	Wolffi	85/273	31,14	25,64-36,63
8	Wolffi	117/328	35,67	30,49-40,85
	Shermani	64/328	19,51	15,22-23,80
9	Wolffi	82/196	41,84	34,93-48,74
	Shermani	40/196	20,41	14,76-26,05
10	Gripothyphosa	44/114	38,60	29,66-47,53
	Shermani	30/114	26,32	18,23-34,40

* Frequência calculada do total de reações aproveitadas, uma vez que, nesta análise, aquelas em que houve empate, título mais alto igual para duas ou mais sorovariedades, foram desconsideradas.

Em relação ao título de anticorpos, o maior número de reações na MAT foi de 800 ou mais, em 763 amostras, e o menor foi o título de 100, em 424 amostras (Figura 5).

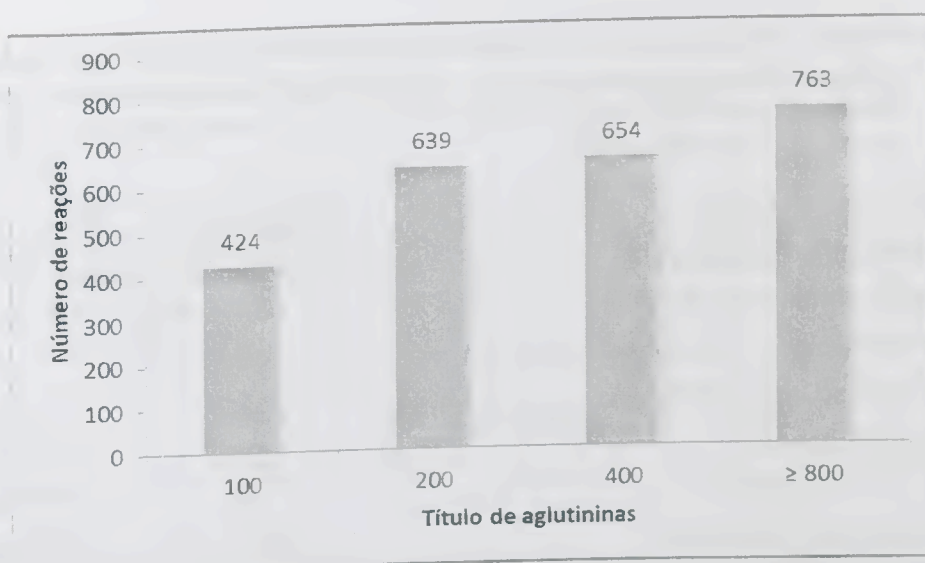


Figura 5. Número de reações às sorovariedades de *Leptospira* spp. para cada título de aglutininas no teste de soroaglutinação microscópica, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Quando considerado o sorogrupo provável de infecção, o mais frequente foi o Sejroe (estirpes Hardjo, Wolffi e Guaricura), com frequência de 39,96% (991/2.480), seguido de Shermani (estirpe Shermani), com 18,43% (457/2.480), e Hebdomadis (estirpes Goiano e Hebdomadis) com 9,92% (246/2.480) (Tabela 5).

Tabela 5. Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico de leptospirose, de acordo com o sorogrupo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Sorogrupo (Sorovares)	Reagentes	Frequência (%)
Sejroe(Hardjo+Wolffi+Guaricura)	991	39,96
Shermani(Shermani)	457	18,43
Hebdomadis(Goiano+Hebdomadis)	246	9,92
Grippotyphosa(Grippo+ 2ACAP)	202	8,14
Pyrogenes(Pyrogenes)	151	6,09
Pomona (Pomona+GR6)	143	5,77
Australis(Australis+Bratislava)	111	4,47
Icterohemorrhagiae(Ictero+Cop+LO10)	52	2,10
Tarassovi(Tarassovi)	29	1,17
Canicola(Canicola+LO04+LO14)	24	0,97
Celledoni(Whitcombi)	22	0,89
Autumnalis(Autumnalis+Butembo)	20	0,81
Não identificado (110/06)	18	0,72
Cynopteri(Cynopteri)	10	0,40
Panama(Panama)	3	0,12
Seramanga (Patoc)	1	0,04
Andamana(Andamana)	0	0,00
Ballum(Castellonis)	0	0,00
Bataviae(Batavie+Brasilienses)	0	0,00
Djasiman(Sentot)	0	0,00
Javanica(Javanica)	0	0,00
Total	2.480	100,00

5.2. Frequência de reagentes (fêmeas e machos)

O teste de MAT revelou que, entre as 4.276 fêmeas estudadas e os 353 machos, a prevalência de reagentes foi de 84,24% (IC 95%: 83,14% – 85,33%) em fêmeas e de 60,06% (IC 95%: 52,06% – 62,39%) em machos (Tabela 6). Verificou-se que a variável sexo está associada ($P=0,0000$) ao risco de infecção por

Leptospira spp., sendo as fêmeas mais suscetíveis ao risco de infecção, com 1,4026 (IC95%: 1,2870-1,5287) vezes mais chance de adquirir a infecção do que os machos.

Tabela 6. Resultado, conforme o número (nº) e a frequência (%), do teste de soroaglutinação (MAT), de acordo com o sexo dos bovinos reagentes a pelo menos uma sorovariedade de *Leptospira* spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Sexo	MAT			
	Nº	Reagentes	%	IC (95%)
Fêmea	4.276	3.602	84,24	83,15 – 85,33
Macho	353	212	60,06	52,06 – 62,39
Total	4.629	3.814	82,39	81,30 – 83,49

5.3. Isolamento

Após os testes sorológicos, foram colhidas, em maio de 2015, amostras de urina de 189 animais, de cinco rebanhos, para tentativa de isolamento e posterior tipificação. As amostras inoculadas nos meios Fletcher e EMJH foram analisadas semanalmente, até a 24ª semana. Porém não foi possível observar multiplicação bacteriana em nenhuma das amostras coletadas.

5.4. Coleção de antígenos de referência *versus* a coleção de antígenos com adição de estirpes de leptospiros isoladas no Brasil

Dos 4.629 animais avaliados pelo teste de MAT, foram observados 3.757 bovinos sororreagentes a pelo menos uma das 24 sorovariedades utilizadas de *Leptospira* spp., com título igual ou acima de 1:100 a uma ou mais sorovariedade de leptospira, representando 81,16% de positividade. Quando utilizadas 33 sorovariedades (antígenos de referência e nove estirpes autóctones isoladas no Brasil), dos 4.629 soros de bovinos testados, 3.814 (82,39%) foram positivos a uma ou mais sorovariedade no MAT. Sendo assim, a adição das estirpes autóctones resultou no aumento de 57 (1,23%) amostras positivas (Tabela 7).

Tabela 7. Reagentes e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, de acordo com o rebanho, com a coleção de 24 sorovariedades e a de 33 sorovariedades de *Leptospira* spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014

Rebanho	24 sorovariedades*			33 sorovariedades**		
	Reagentes	(%)	IC 95% (%)***	Reagentes	(%)	IC 95% (%)
1	90/126	71,43	63,54-79,32	91/126	72,22	64,40-80,04
2	430/501	85,83	82,77-88,88	430/501	85,83	82,77-88,88
3	345/535	64,48	60,43-68,54	351/535	65,61	61,58-69,63
4	528/694	76,08	72,91-79,25	531/694	76,51	73,36-79,67
5	552/639	86,38	83,73-89,04	559/639	87,48	84,91-90,05
6	363/419	86,63	83,38-89,89	365/419	87,11	83,90-90,32
7	513/522	98,27	97,16-99,39	515/522	98,66	97,26-99,35
8	454/526	86,31	83,37-89,25	478/526	90,87	88,41-93,34
9	308/445	69,21	64,92-73,50	320/445	71,91	67,73-76,09
10	174/222	78,38	72,96-83,79	174/222	78,38	72,96-83,79
Total	3.757/4.629	81,16	80,04-82,29	3.814/4.629	82,39	81,30-83,49

*Antígenos de referência

**Antígenos de referência e estirpes autóctones

O rebanho 7 foi o que obteve a maior frequência de animais sororreagentes no MAT, com 98,27% (513/522) quando utilizada a coleção com 24 sorovariedades, e quando utilizada a coleção com as sorovariedades autóctones ainda houve acréscimo de mais dois animais soropositivos, aumentando a frequência para 98,66% (515/522).

O rebanho 8 foi o que apresentou o maior aumento de animais positivos quando adicionadas as nove estirpes isoladas no Brasil na coleção de antígenos, assim, a frequência de animais positivos aumentou de 86,31% (454/526) para 90,87% (478/526) (Tabela 7, Figura 6).

Estatisticamente, pelo teste de Mc Nemar ou pelo teste binomial, em relação à análise por rebanho, apesar desses relativos aumentos na frequência de animais positivos, houve diferença significativa ($P < 0,05$) apenas para três rebanhos (3,4,9), quando utilizada a coleção de antígenos de referência e quando inseridas as estirpes locais (Tabela 8).

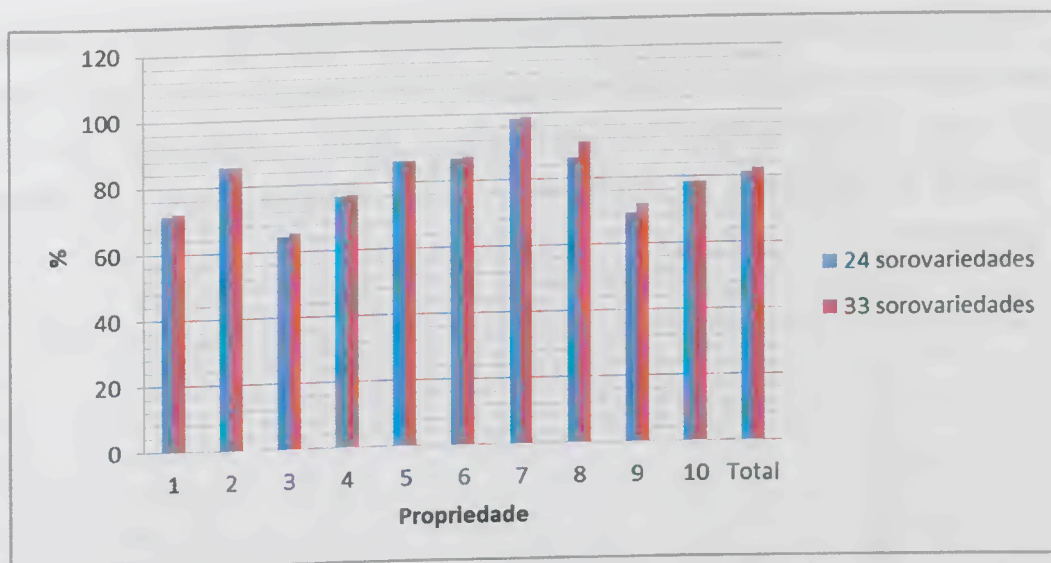


Figura 6. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soraglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando a coleção de 24 sorovariedades e a de 33 sorovariedades de *Leptospira* spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014

Considerando apenas a sorovariedade de maior título e desconsiderando os animais que obtiveram títulos iguais contra duas ou mais sorovariedades, observou-se o predomínio da sorovariedade Wolffi, quando utilizada a coleção com 24 sorovariedades, com frequência de 39,84% (1.045/2.623), e também ao inserir as nove sorovariedades, com frequência de 36,49% (905/2.480). Em seguida encontram-se as sorovariedades Shermani e Hebdomadis entre as mais frequentes, quando utilizadas as 24 sorovariedades de referência e também quando acrescidas as nove sorovariedades autóctones (Figura 7, Tabela 8). Apesar das diferenças observadas, com base nos intervalos de confiança, não se diferenciaram estatisticamente, quando utilizada a coleção de antígenos de referência e quando inseridas as estirpes locais.

Observou-se que entre as nove estirpes autóctones utilizadas, a de maior ocorrência foi a Guaicurus, com frequência de 2,5% (62/2.480), seguida da Goiano, com 1,25% (31/2.480), e LO10, com 0,77% (17/2.480).

Notou-se alta ocorrência de coaglutinação, principalmente quando adicionadas as nove estirpes autóctones. Dos 4.629 animais avaliados pelo teste de MAT, foram observados 3.757 bovinos sororreagentes a pelo menos uma das 24 sorovariedades. Quando utilizadas 33 sorovariedades, 3.814 foram positivos a uma

ou mais sorovariedade no MAT. E quando considerada apenas a sorovariedade de maior título e desconsiderando os animais que obtiveram títulos iguais contra duas ou mais sorovariedades (coaglutinações), foram consideradas 2.623 reações quando se utilizaram 24 antígenos e 2.480 reações quando se utilizaram 33 antígenos.

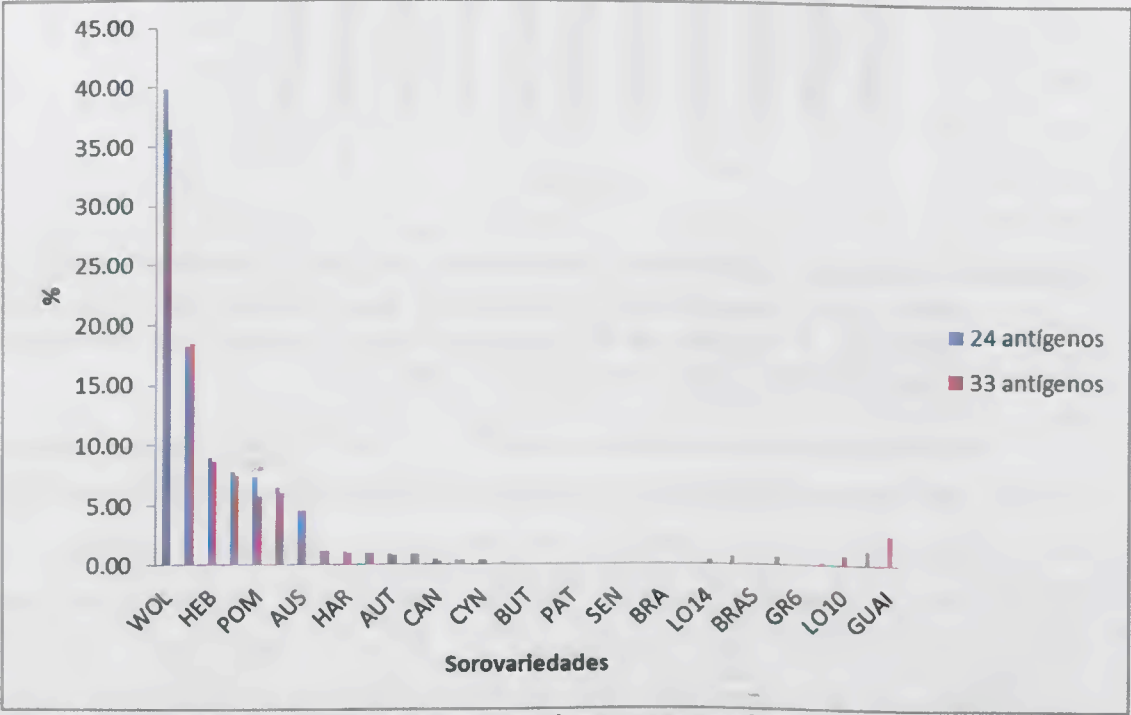


Figura 7. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção, utilizando a coleção de 24 sorovariedades e a de 33 sorovariedades de *Leptospira* spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Tabela 8. Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, de acordo com a sorovariedade mais provável de infecção, utilizando a coleção de 24 sorovariedades e a de 33 sorovariedades de *Leptospira* spp., Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Sorovar	24 sorovariedades			33 sorovariedades		
	Reagentes	(%)	IC 95% (%)	Reagentes	(%)	IC 95% (%)
WOL	1.045/2.623	39,84	37,97-41,71	905/2.480	36,49	34,60-38,39
SHE	479/2.623	18,26	16,78-19,74	457/2.480	18,43	16,90-19,95
HEB	235/2.623	8,96	7,87-10,05	215/2.480	8,66	7,56-9,78
GRI	204/2.623	7,78	6,75-8,80	185/2.480	7,46	6,43-8,49
POM	193/2.623	7,36	6,36-8,36	142/2.480	5,73	4,81-6,64
PYR	168/2.623	6,40	5,47-7,34	151/2.480	6,09	5,15-7,03
AUS	119/2.623	4,54	3,80-5,40	111/2.480	4,48	3,73-5,36
TAR	32/2.623	1,22	0,87-1,72	29/2.480	1,17	0,82-1,67
HAR	29/2.623	1,11	0,77-1,58	24/2.480	0,97	0,65-1,44
ICT	27/2.623	1,03	0,71-1,49	24/2.480	0,97	0,65-1,44
AUT	25/2.623	0,95	0,65-1,40	20/2.480	0,81	0,52-1,24
WHI	25/2.623	0,95	0,65-1,40	22/2.480	0,89	0,59-1,34
CAN	13/2.623	0,49	0,29-0,85	08/2.480	0,32	0,16-0,64
COP	11/2.623	0,42	0,23-0,75	09/2.480	0,36	0,19-0,69
CYN	11/2.623	0,42	0,23-0,75	10/2.480	0,40	0,22-0,74
PAN	04/2.623	0,15	0,06-0,39	03/2.480	0,12	0,04-0,36
BUT	01/2.623	0,04	0,01-0,22	00/2.480	0,00	0-0,15
JAV	01/2.623	0,04	0,01-0,22	00/2.480	0,00	0-0,15
PAT	01/2.623	0,04	0,01-0,22	01/2.480	0,04	0,01-0,23
BAT	00/2.623	0,00	0-0,15	00/2.480	0,00	0-0,15
SEN	00/2.623	0,00	0-0,15	00/2.480	0,00	0-0,15
AND	00/2.623	0,00	0-0,15	00/2.480	0,00	0-0,15
BRA	00/2.623	0,00	0-0,15	00/2.480	0,00	0-0,15
CAS	00/2.623	0,00	0-0,15	00/2.480	0,00	0-0,15
GUAI	-	-	-	62/2.480	2,5	1,96-3,19
GOI	-	-	-	31/2.480	1,25	0,88-1,77
LO10	-	-	-	19/2.480	0,77	0,49-1,19
110/06	-	-	-	18/2.480	0,73	0,46-1,14
2ACAP	-	-	-	17/2.480	0,68	0,43-1,10
LO14	-	-	-	10/2.480	0,40	0,22-0,74
LO04	-	-	-	06/2.480	0,24	0,11-0,53
GR6	-	-	-	01/2.480	0,04	0,01-0,23
BRAS	-	-	-	00/2.480	0,00	0-0,15
TOTAL	2.623/2.623	100,00		2.480/2.480	100,00	

* Antígenos de referência. ** Antígenos de referência, acrescidos das estirpes autóctones. *** Frequência calculada do total de reações aproveitadas, uma vez que, nesta análise, aquelas em que houve empate, título mais alto idêntico contra duas ou mais variantes sorológicas, foram desconsideradas.

Quando considerado o sorogrupo provável de infecção, empregando os 24 antígenos, o sorogrupo mais frequente foi o Sejroe (estirpes Hardjo, Wolffi), com frequência de 40,94% (1.074/2.623), seguido de Shermani (Shermani), com 18,26% (479/2.623), e Hebdomadis (Hebdomadis), com 8,96% (235/2.623) (Tabela 9, Figura 8).

Tabela 9. Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando 24 antígenos de referência, de acordo com o sorogrupo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Sorogrupo (Sorovar)	Reagentes	Frequência (%)*	IC 95% (%)
Sejroe (Hardjo+Wolffi)	1.074	40,94	39,06-42,83
Shermani (Shermani)	479	18,26	16,78-19,74
Hebdomadis (Hebdomadis)	235	8,96	7,87-10,05
Grippotyphosa (Grippotyphosa)	204	7,78	6,75-8,80
Pomona (Pomona)	193	7,36	6,36-8,36
Pyrogenes(Pyrogenes)	168	6,40	5,47-7,34
Australis(Australis + Bratislava)	119	4,54	3,80-5,40
Icterohemorrhagiae (Ictero+Copen)	38	1,45	1,06-1,98
Tarassovi (Tarassovi)	32	1,22	0,86-1,72
Autumnalis (Autumnalis+Butembo)	26	0,99	0,68-1,45
Celledoni (Whitcombi)	25	0,95	0,65-1,40
Canicola (Canicola)	13	0,50	0,29-0,85
Cynopteri (Cynopteri)	11	0,42	0,23-0,75
Panama (Panama)	4	0,15	0,06-0,39
Seramanga (Patoc)	1	0,04	0,01-0,21
Javanica (Javanica)	1	0,04	0,01-0,21
Andamana (Andamana)	0	0,00	0-0,15
Ballum (Castellonis)	0	0,00	0-0,15
Bataviae (Bataviae)	0	0,00	0-0,15
Djassiman (Sentot)	0	0,00	0-0,15
Total	2.623	100,00	-

* Frequência calculada do total de reações aproveitadas, uma vez que, nesta análise, aquelas em que houve empate, título mais alto idêntico contra duas ou mais variantes sorológicas, foram desconsideradas.

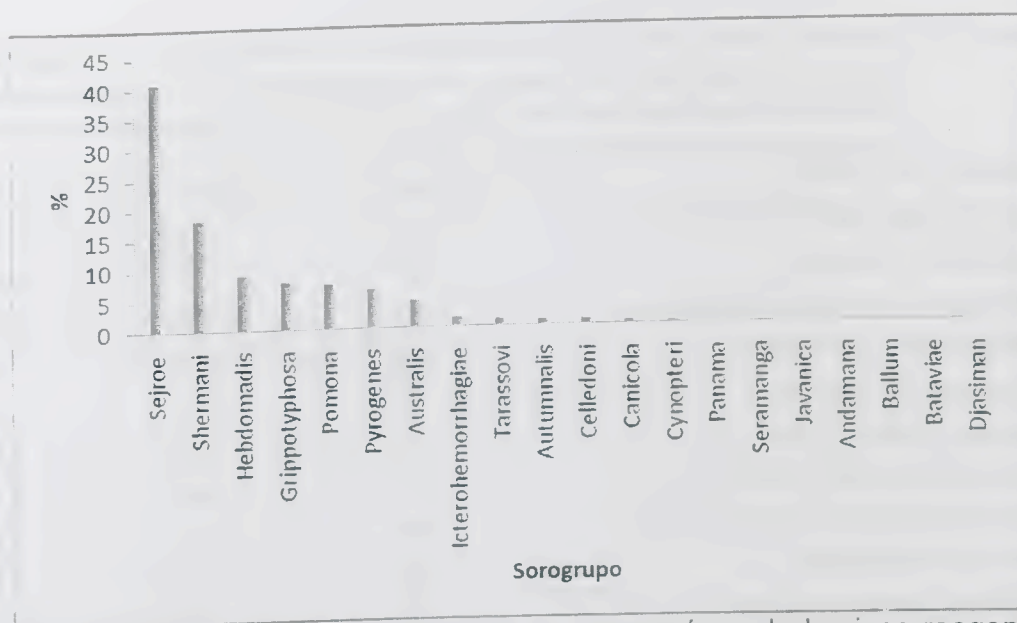


Figura 8. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando 24 antígenos de referência, de acordo com o sorogruppo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

O sorogruppo provável de infecção, empregando os 33 antígenos, foi o Sejroe (estirpes Hardjo, Wolffi e Guaricura), com frequência de 39,96% (991/2.480), seguido de Shermani (Shermani), com 18,43% (457/2.480), e Hebdomadis (estirpes Goiano e Hebdomadis), com 9,92% (246/2.480) (Tabela 10, Figura 8).

Tabela 10. Número (reagentes) e frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando 33 sorovariedades, de acordo com o sorogrupo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

Sorogrupo (Sorovares)	Reagentes	Frequência (%)*	IC 95% (%)
Sejroe (Hardjo+Wolffi+Guaricura)	991	39,96	38,03-41,89
Shermani (Shermani)	457	18,43	16,90-19,95
Hebdomadis (Goiano+Hebdomadis)	246	9,92	8,74-11,10
Grippytyphosa (Grippe+ 2ACAP)	202	8,14	7,07-9,22
Pyrogenes (Pyrogenes)	151	6,09	5,15-7,03
Pomona (Pomona+GR6)	143	5,77	4,85-6,68
Australis (Australis+Bratislava)	111	4,47	3,73-5,36
Icterohemorrhagiae (Ictero+Cop+LO10)	52	2,10	1,60-2,74
Tarassovi (Tarassovi)	29	1,17	0,82-1,67
Canicola (Canicola+LO04+LO14)	24	0,97	0,65-1,44
Celledoni (Whitcombi)	22	0,89	0,59-1,34
Autumnalis (Autumnalis+Butembo)	20	0,81	0,52-1,24
Não identificado (110/06)	18	0,72	0,46-1,14
Cynopteri (Cynopteri)	10	0,40	0,22-0,74
Panama (Panama)	3	0,12	0,04-0,36
Seramanga (Patoc)	1	0,04	0,01-0,23
Andamana(Andamana)	0	0,00	0-0,15
Ballum (Castellonis)	0	0,00	0-0,15
Bataviae (Batavie+Brasilienses)	0	0,00	0-0,15
Djasiman (Sentot)	0	0,00	0-0,15
Javanica (Javanica)	0	0,00	0-0,15
Total	2.480	100,00	

* Frequência calculada do total de reações aproveitadas, uma vez que, nesta análise, aquelas em que houve empate, título mais alto idêntico contra duas ou mais variantes sorológicas, foram desconsideradas.

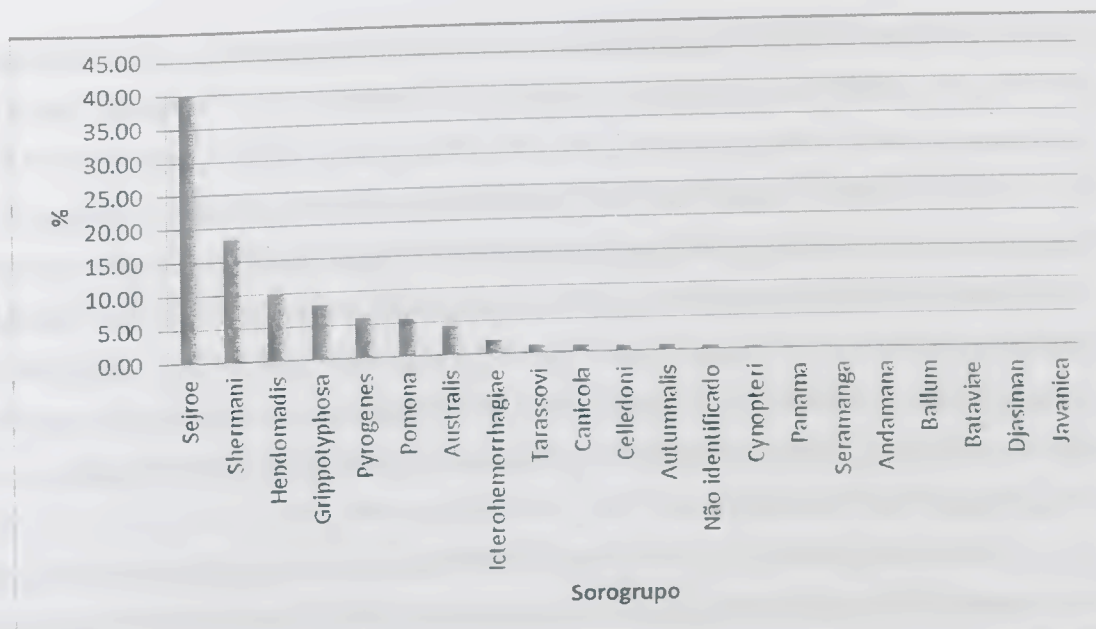


Figura 9. Frequência (%) de amostras de soro sanguíneo de bovinos reagentes no teste de soraglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, utilizando 33 sorovariedades, de acordo com o sorogruppo empregado, Mato Grosso do Sul, MS, 2014.

6. DISCUSSÃO

A prevalência de 82,39% (IC 95%: 81,30% – 83,49%) de animais sorreagentes a *Leptospira* spp. no MAT e de 100% dos rebanhos reagentes foi consideravelmente alta. Favero et al. (2001) e Figueiredo et al. (2009) também verificaram alta frequência de bovinos reagentes a *Leptospira* spp. no Estado de Mato Grosso do Sul, com prevalência de 62,3% (550/882) e 98,8% (1.801/2.573), respectivamente. Segundo Oliveira et al. (2010), flutuações na sororreatividade no decorrer do tempo podem ser atribuídas a fatores intrínsecos e extrínsecos que modificam a tríade epidemiológica (agente etiológico, hospedeiro e ambiente).

De acordo com Faine (1982), a existência e a dispersão da doença são mais favorecidas nas regiões tropicais e subtropicais em comparação com as regiões temperadas, devido à persistência e à manutenção das bactérias em ambientes alagados, podendo sobreviver por até 180 dias, dependendo das condições de temperatura (28°C a 30°C) e pH (7,2 a 7,4). Sabe-se que, na maior parte do território do Estado de Mato Grosso do Sul, predomina o clima do tipo tropical, com chuvas

de verão e inverno seco, caracterizado por médias termométricas que variam entre 26°C na baixada do Paraguai e 23°C no Planalto, e a pluviosidade é de aproximadamente 1.500 mm anuais (BORLACHENCO; GONÇALVES; 2017).

Nesse sentido, sugere-se que a alta frequência de animais sororreagentes no presente estudo pode ser principalmente atribuída aos fatores extrínsecos presentes no Estado de Mato Grosso do Sul, que apresenta estrutura ecológica favorável à disseminação e à endemidade da leptospirose, devido às condições de temperatura e umidade, associadas à presença de reservatórios domésticos (bovinos, suínos, equinos, cães) e silvestres que favorecem a manutenção e a disseminação de *Leptospira*.

Esta alta prevalência de animais sororreagentes a *Leptospira* pode também ser atribuída ao tipo de exploração adotada na criação de bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul, visto que em sua maioria os bovinos são criados em sistema extensivo, e, desta forma, o que pode favorecer a ocorrência da doença no rebanho é o contato dos bovinos com outras espécies animais, sobretudo as silvestres, que podem ser importantes reservatórios do agente etiológico da doença, favorecendo a permanência e a disseminação da *Leptospira* no rebanho.

Alguns pesquisadores (GIRIO et al., 2004; VIEIRA et al., 2011; VIEIRA et al., 2013) já relataram a importância da leptospirose em animais silvestres no Estado de Mato Grosso do Sul, e até mesmo obtiveram animais sororreagentes nos inquéritos sorológicos realizados nessa região. Girio et al. (2004) afirmaram que a fauna silvestre havia sido pouco estudada nas espécies nativas de cada região, deixando uma possível lacuna no estudo da cadeia epidemiológica, dificultando a elaboração de planos estratégicos de controle dessa doença em regiões com grande densidade de animais, matas e rios.

Ainda em relação à diversidade de hospedeiros, sabe-se que a leptospirose é uma doença de importância em Saúde Pública, e nesse sentido atenção também deve ser dada não somente aos animais domésticos e silvestres, mas também aos humanos que trabalham com o manejo dos animais, pois, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre os anos 2010 e 2015, foram notificados 41 casos de leptospirose humana no Estado de Mato Grosso do Sul, e destes infectados três foram a óbito (BRASIL, 2015). Desta forma, torna-se

importante a conscientização, por meio de atividades como palestras e cursos aos produtores sobre a transmissão e quais as medidas preventivas que devem ser adotadas durante a lida com os animais.

Em relação ao título de anticorpos, o maior número de reações na MAT foi de 800 ou mais, em 763 amostras, e o menor foi o título de 100, em 424 amostras. Segundo Chiareli et al. (2008), altos títulos, principalmente aqueles iguais ou superiores a 400, evidenciam que houve contato recente com essas leptospiros e que, em alguns casos, pode até haver evolução para uma doença grave.

Em relação à distribuição espacial de sororreagentes por rebanhos, observou-se que a propriedade sete, localizada na mesorregião Pantanaís, foi a que apresentou o maior número de animais sororreagentes. Vieira (2009) afirmou que no Pantanal Sul-Matogrossense as condições ecológicas e climáticas são altamente favoráveis à ocorrência da leptospirose, uma vez que o agente etiológico sobrevive mais tempo em áreas alagadas e de temperaturas elevadas.

A ocorrência de animais reagentes contra as sorovariedades Wolffi (36,49%), Shermani (18,43%) e Hebdomadis (8,66%) foi a predominante neste estudo. Diferentemente, grande parte dos inquéritos sorológicos recentes demonstram a predominância da sorovariedade Hardjo como a mais provável de infecção nos bovinos (OLIVEIRA et al., 2010; HASHIMOTO et al., 2012; SILVA et al., 2012; COELHO et al., 2014; PIMENTA et al., 2014; JULIANO et al., 2016), e apesar desse fato, no presente estudo apenas 0,97% dos animais foram reagentes a essa sorovariedade. Araújo et al. (2005) ainda afirmam que porcentagens iguais ou inferiores a 1%, de qualquer sorovariedade que infecta bovinos, podem ser consideradas como reações cruzadas quando não existe registro de isolamento. Visto que a sorovariedade mais provável nesse estudo foi a Wolffi, de acordo com Faine (1982), provavelmente por essas sorovariedades serem do mesmo sorogrupo (Sejroe), esse resultado pode ser devido às reações cruzadas entre essas sorovariedades. Segundo Ellis (1994), a sorovariedade Hardjo é a mais adaptada à espécie bovina, podendo ocorrer infecção independentemente das estações chuvosas e dos sistemas de criação. Porém Vasconcellos et al. (1997) afirmam que, apesar de as sorovariedades Hardjo e Wolffi coexistirem nos rebanhos bovinos

brasileiros, a que causa maior impacto na produção animal ainda é a sorovariedade Hardjo.

Apesar disso, a sorovariedade Wolffi, foi a provável de infecção nos rebanhos estudados, e houve relatos de abortamentos em todos os rebanhos; desta forma, sugere-se a importância desta sorovariedade como causa de perdas reprodutivas. Alguns produtores (rebanhos 2, 7, 8, 9) relataram a dificuldade de se ter ao certo os índices zootécnicos, devido à criação extensiva e à falta de mão de obra para verificar os abortamentos, mas relataram perdas de animais por abortamentos e natimortalidade, e nos rebanhos 1, 3, 4, 5, 6 e 10 verificou-se, em números, que essas perdas reprodutivas (abortamento e natimortalidade) eram altas, variando entre 2% e 8%.

Enquanto muitos trabalhos relatam a ocorrência associada entre Hardjo e Wolffi, no presente trabalho a ocorrência associada predominante nos rebanhos foi a das sorovariedades Wolffi e Shermani, que ocorreu em 50% das propriedades analisadas.

O predomínio da sorovariedade Wolffi em bovinos concorda com os resultados obtidos por Campos Júnior et al. (2006), Juliano et al. (2000) e Langoni et al. (2000), e reforça a importância de pesquisas que buscam o isolamento desta sorovariedade, uma vez que ela nunca foi isolada de bovinos brasileiros, e pode ser importante na disseminação e na manutenção da leptospirose nos rebanhos brasileiros.

A sorovariedade Shermani, segunda mais frequente nos bovinos analisados neste estudo, ficou também entre as mais prováveis de infecção em bovinos nos estudos de Aguiar et al. (2006b), Campos Júnior et al. (2006), Castro et al. (2008) e Hashimoto et al. (2010). É importante enfatizar que esta sorovariedade já foi detectada em inquéritos sorológicos em outras espécies, como: tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (MIRANDA et al., 2014), roedores sinantrópicos (LENHARO; SANTIAGO; LUCHEIS, 2012), equinos (SANTOS et al., 2016), suínos (AGUIAR et al., 2006a), cães (AGUIAR et al., 2007), ovinos (MACHADO et al., 2016), caprinos e ovinos (LILENBAUM et al., 2009). Tais achados sugerem que a ocorrência de infecções incidentais, causadas por sorovares que não são mantidos

pelos bovinos, como a Shermani, possa dever-se ao contato das diversas espécies animais com ambientes contaminados pela *Leptospira*.

Ainda em relação à sorovariedade Shermani, deve-se enfatizar que ela já foi isolada de roedores no Panamá (SULZER; POPE; ROGERS, 1982) e no Brasil (LINS; SANTA ROSA, 1976), e este isolado brasileiro foi obtido no Estado do Mato Grosso, que possui fronteira com Mato Grosso do Sul, em grande parte da sua extensão territorial. No momento da colheita das amostras deste estudo os produtores/funcionários informaram sobre a presença de roedores nas propriedades, e as queixas foram principalmente em relação às capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), que são roedores selvagens, e também aos catetos (*Tayassu tajacu*). Ito et al. (1998), De Paula (2003) e Silva et al. (2009), ao realizarem investigações sorológicas para detecção de infecção por leptospiros em capivaras no Brasil, encontraram animais sororreagentes a diversas sorovariedades. Marvulo et al. (2002) e Ahmed et al. (2006) já isolaram leptospiros do rim de capivaras abatidas, confirmando assim o importante papel desta espécie como reservatório da bactéria. Nesse sentido, vários estudos registram a ocorrência de capivaras sororreagentes a leptospira, porém em relação aos catetos não existe registro na literatura de animais positivos para *Leptospira* spp., reforçando talvez a importância da pesquisa no que se refere a essa espécie, já que, os catetos podem ser uma provável fonte de infecção, devido ao estreito contato entre as espécies (bovinos e catetos).

Desta forma, sugere-se a realização de estudos com essas espécies no ecossistema local, visto que a positividade e os títulos expressivos contra a sorovariedade Shermani ocorreram nos bovinos, e as capivaras e os catetos podem ser uma das prováveis fontes de infecção para leptospirose nesse ecossistema.

A sorovariedade Hebdomadis foi a terceira de maior ocorrência nos animais analisados neste estudo, com 8,66% (215/2.480). Esta sorovariedade foi pela primeira vez isolada de tatus (*Dasypus novemcinctus*) (LINS; LOPES, 1984), e alguns trabalhos relataram a ocorrência de reações sorológicas em bovinos (HOMEM et al., 2001; ARAÚJO et al., 2005; AGUIAR et al., 2006b; MINEIRO et al., 2007, CASTRO et al., 2008; CASTRO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2012). Ainda existe a preocupação com essa sorovariedade em relação à saúde pública, uma vez

que Homem et al. (2001) encontraram bovinos e humanos sororreagentes a *Hebdomadis* em propriedades familiares do município de Uruará (PA).

Em relação a essas sorovariedades mais prováveis de infecção nos rebanhos do Estado de Mato Grosso do Sul, deve-se atentar ao fato de que a imunidade adquirida é sorovariedade-específica, e a imunização protege somente contra as sorovariedades homólogas ou semelhantes antigenicamente. As vacinas comercializadas no mercado para bovinos têm em sua composição os antígenos: Pomona, Wolffii, Hardjo, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* e *Gryppotyphosa*, desta forma os animais não estão protegidos contra as sorovariedades *Shermani* e *Hebdomadis*, que tiveram alta prevalência neste e em outros estudos relacionados à leptospirose bovina. Além da vacinação, Castro et al. (2008) ainda ressaltaram que muitas vezes as sorovariedades como *Shermani*, *Hebdomadis* e *Autumnalis* não estão presentes em baterias de exames de rotina, e podem estar presentes infectando rebanhos, porém não estão sendo detectadas.

Das 33 estirpes utilizadas na MAT, apenas 8 (*Butembo*, *Javanica*, *Bataviae*, *Sentot*, *Andamana*, *Bratislava*, *Castellonis*, *Brasiliensis*) não foram detectadas na prova sorológica. Segundo Castro et al. (2008), é importante a abrangência de sorovariedades utilizadas na MAT, pois desta forma podem ser percebidas as mudanças ou flutuações nos perfis sorológicos de uma população, região ou mesmo país e a correta instituição de vacinas protetoras sorovar-específicas, até que surjam no mercado vacinas recombinantes e gênero-específicas.

Sabe-se que o animal doente, convalescente da infecção aguda ou portador transmite o agente etiológico a outros animais, sem distinção de idade e sexo (GENOVEZ, 2016). Porém verificou-se no presente estudo que as fêmeas foram mais suscetíveis ao risco de infecção, com 1,4026 (IC95%: 1,2870-1,5287) vezes mais chance de adquirir a infecção do que os machos. Alguns trabalhos também evidenciaram maior ocorrência em fêmeas não só bovinas (LANGONI et al., 2000), mas também em fêmeas equinas (SANTOS et al., 2016). Apesar disso, deve-se levar em consideração que os machos utilizados no estudo são reprodutores e apresentaram uma frequência relativamente alta de sororreagentes, com 60,06% (IC95%: 52,06% – 62,39%). Alguns autores afirmam que os bovinos infectados podem eliminar o agente pela urina por um período de tempo que pode chegar até a

um ano, apesar do caráter intermitente da eliminação do microrganismo (SLEIGHE; WILLIAMS, 1961; THIERMANN, 1984), e isso é importante porque a uretra é comum à passagem do sêmen e da urina. Campos Junior et al. (2006) ainda enfatizam a possibilidade de um touro portador transmitir a doença de forma venérea, tornando-se este grupo importante no que tange à monitoração da situação epidemiológica do rebanho.

Nesse sentido, sugere-se a adoção de medidas profiláticas com o objetivo de reduzir a prevalência da infecção pelas sorovariedades mantidas na população, já que o agente etiológico é responsável por baixo desempenho reprodutivo causado por: infertilidade, abortamentos, natimortalidade, nascimentos de animais prematuros e bezerras fracos entre outros, e que por consequência representa, para a bovinocultura de corte, prejuízos econômicos.

Na comparação entre o diagnóstico com as cepas de referência (24 sorovariedades) utilizadas na rotina laboratorial em relação às cepas de referência acrescidas de estirpes isoladas (33 sorovariedades) no Brasil, observou-se que, das 4.629 amostras analisadas, 3.757 (81,16%) foram sororreagentes a pelo menos uma das 24 sorovariedades utilizadas de *Leptospira* spp., e quando utilizadas 33 sorovariedades (antígenos de referência e nove estirpes autóctones isoladas no Brasil), dos 4.629 soros de bovinos testados, 3.814 (82,39%) foram positivos a uma ou mais sorovariedade no MAT. Em relação à análise por rebanho, apesar de relativo aumento na frequência de animais positivos, houve diferença significativa apenas para três rebanhos quando utilizada a coleção de antígenos de referência e quando inseridas as estirpes locais. Pinto et al. (2015), Sarmento et al. (2012), Brod et al. (2005) e Herrmann et al. (2004) também observaram aumento no número de animais reagentes quando adicionadas estirpes isoladas na coleção de antígenos.

O sorogrupo Sejroe foi o mais frequente no presente estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinto et al. (2015), em cuja pesquisa o sorogrupo Sejroe foi o mais frequente, com 38,1% de animais positivos. O sorogrupo Sejroe é bem conhecido como o principal sorogrupo na leptospirose bovina e determina vários problemas reprodutivos, principalmente aborto. Além do sorogrupo Sejroe, reações contra antígenos pertencentes ao sorogrupo Shermani e Hebdomadis foram frequentes quando utilizadas as duas coleções de antígenos.

Observou-se que, entre as nove estirpes isoladas utilizadas, a de maior ocorrência foi a Guaicurus, com frequência de 2,5% (62/2.480), seguida da Goiano, com 1,25% (31/2.480), e LO10, com 0,77% (17/2.480). De fato, trata-se de uma importante inserção na coleção de antígenos no caso de estudos em bovídeos, uma vez que Guaicurus, Goiano e LO10 foram isoladas de bovídeos, e apresentaram, apesar de baixa ocorrência, animais sorreagentes. Sarmento et al. (2012), ao acrescentarem na coleção de antígenos dez estirpes autóctones, também observaram o sorovar Guaicurus entre os de maior ocorrência nos rebanhos. Loureiro et al. (2016) afirmam que não somente a sorovariedade Hardjo é importante dentro do sorogrupo Sejroe, sugerindo que outras sorovariedades, além desta, estejam disseminadas em bovinos no país, entre elas a *L. santarosai* sorotipo Guaricura. Nesse sentido, tem-se a preocupação em relação à imunização desses animais. Tabata (2002) enfatizou em seu trabalho a importância do encontro de uma estirpe do sorogrupo Sejroe que conferisse proteção contra os três representantes dos sorovares mais encontrados no Brasil: Hardjo, Wolffi e Guaricura, relatando que os custos de produção da imunógeno diminuiria e ocorreria o aumento do poder imunogênico das bacterinas. Sabe-se que atualmente em relação a esse sorogrupo os únicos representantes nas vacinas brasileiras são as sorovariedades Hardjo e Wolffi, e dessa forma sugere-se em algumas regiões até mesmo o estudo sobre a inserção da sorovariedade Guaicurus nos imunógenos, principalmente devido a sua ocorrência em rebanhos bovinos brasileiros.

Notou-se alta ocorrência de coaglutinação, principalmente quando adicionadas as nove estirpes autóctones. Apesar de Levett (2001) afirmar que os títulos obtidos com as estirpes locais são geralmente mais elevados que os observados com os sorovares de referência do mesmo sorogrupo, observou-se no presente estudo que, quando utilizadas as estirpes locais, os títulos contra elas foram baixos, e conseqüentemente, quando adotado o critério do sorovar mais provável, essas reações foram desconsideradas. Genovez et al. (2011) também relataram essa dificuldade, afirmando que por vezes o empate de frequência e magnitude de títulos entre eles impossibilitou o estabelecimento do provável infectante. Outro fato observado foi que nem sempre as reações cruzadas (coaglutinações) ocorriam dentro do mesmo sorogrupo, reforçando o argumento de

Faine (1993) e Acha e Szyfres (2001), que mencionaram que na MAT as reações cruzadas também podem ocorrer entre sorogrupos distintos, principalmente na fase aguda da doença.

Nesse sentido, observa-se que, apesar das dificuldades metodológicas, são necessários estudos posteriores de isolamento e caracterização de estirpes locais, com o objetivo de identificar os sorovares circulantes, para emprego no MAT. Segundo Chiareli et al. (2012), a identificação e a caracterização de leptospiros são fundamentais tanto para a obtenção de um diagnóstico preciso como para a produção de vacinas mais eficazes, com a inclusão de sorovariedades que realmente estejam infectando os rebanhos, induzindo uma imunidade mais eficiente e duradoura, que se refletirão, conseqüentemente, no controle da doença e no melhoramento nos indicadores reprodutivos e de produtividade animal.

Neste estudo, mesmo com a alta prevalência de animais sororreagentes e a presença de animais reagentes em todos os rebanhos analisados, não se obteve sucesso no isolamento do microrganismo de animais das cinco propriedades. Alguns fatores podem ter influenciado em tais resultados, como: infecção recente (animais apresentam altos títulos, porém ainda não ocorreu a colonização renal), eliminação intermitente (no momento da coleta o animal não estava eliminando o microrganismo) e pequeno número de leptospiros presentes nas amostras renais (insuficientes para o sucesso no isolamento). Além disso, as amostras são tipicamente contaminadas por outras bactérias, que pode prejudicar a multiplicação de leptospiros, mesmo utilizando filtro 0,22 µm, para evitar a contaminação da amostra por outros microrganismos; alguns autores (LOUREIRO et al., 2015) relatam o uso do meio EMJH-STAFF previamente descrito na recuperação de leptospiros patogênicos a partir de amostras clínicas de bovinos, porém, apesar do sucesso de isolamento utilizando esse meio modificado, ainda é um material caro e não é utilizado na rotina clínica e também não foi utilizado no presente estudo.

De forma geral, ressalta-se a elevada prevalência de leptospirose nos animais e nos rebanhos, sendo necessária a adoção de medidas gerais e específicas de prevenção e controle dessa enfermidade, com o objetivo de atingir melhores indicadores de produção animal nos rebanhos de corte da região.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

- Observou-se alta frequência de bovinos de corte sororreagentes nos rebanhos estudados, demonstrando a relevância da infecção pelo agente etiológico no Estado.
- Os animais foram reagentes a diferentes sorovariedades, sendo a sorovariedade Wolffi a provável de infecção nos animais dos rebanhos de Mato Grosso do Sul.
- Ocorreu maior frequência de reagentes a *Leptospira* spp. entre as fêmeas, evidenciando a importância de medidas específicas de controle da enfermidade nessas categorias. Porém deve-se também atentar-se ao fato de que houve alta prevalência entre os reprodutores.
- Mesmo com a alta prevalência de animais sororreagentes e a presença de animais reagentes em todos os rebanhos analisados, não se obteve isolamento do microrganismo dos animais coletados.
- Houve aumento da frequência de animais positivos quando acrescidas nove estirpes locais na coleção de antígenos, porém esse aumento não justifica a utilização dessas estirpes na coleção de antígenos, uma vez que não houve diferença significativa quando utilizados os 24 antígenos de referência e quando utilizados os 33 antígenos (24 de referência e nove estirpes brasileiras).
- Atenção especial deve ser dada à sorovariedade Guaicurus, devido à sua ocorrência significativa nos rebanhos analisados; desta forma, sugere-se que esta seja inserida na coleção de antígenos quando animais da região são analisados pelo teste de soroaglutinação microscópica.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que a leptospirose implica problemas de saúde humana e animal, e em animais é uma das principais causas de falhas reprodutivas, é importante o estudo das sorovariedades circulantes nos animais e nos rebanhos, já que a imunidade é sorovar-específica e o Brasil possui grandes dimensões e características ecológicas diferentes. Dessa forma, faz-se necessário o conhecimento das estirpes circulantes para a produção de novas vacinas e para a inserção na coleção de antígenos utilizados no diagnóstico da doença.

Vale ressaltar, no entanto, a dificuldade no que se refere à inserção de novas estirpes na coleção de antígenos e à utilização da técnica da sorovariedade mais provável de infecção, pois, quando adotado esse critério, muitas vezes ocorre a coaglutinação até mesmo entre sorogrupos diferentes, e a amostra é descartada da análise. Desta forma, tornam-se importantes estudos posteriores em relação à adoção desse critério, uma vez que o animal apresenta títulos de anticorpos contra determinadas sorovariedades e se houver empate a amostra é descartada dessa análise, porém o animal foi reagente e pode albergar uma sorovariedade de importância clínica e epidemiológica em determinada região.

Ainda em relação às sorovariedades mais prováveis de infecção, medidas de prevenção e controle podem ser direcionadas aos animais por meio da vacinação, das fêmeas e dos machos, com estirpes que anteriormente não eram diagnosticadas e não estão nas vacinas, como, por exemplo, a Guaicurus, que foi a mais prevalente entre as estirpes brasileiras utilizadas neste estudo, e também em relação aos reservatórios do agente etiológico, uma vez que outra sorovariedade de importância foi a Shermani, que normalmente tem envolvimento com animais silvestres, porém não está presente na coleção de antígenos utilizados na rotina, desta forma não sendo diagnosticada, e também não está presente nas vacinas comercializadas no país, desta forma não sendo prevenida.

Outro fato importante refere-se ao manejo com os reprodutores, principalmente na bovinocultura de corte, porque muitas vezes é dada atenção maior às fêmeas, mas nota-se considerável frequência de animais sororreagentes a *Leptospira* spp. que podem ser importantes na transmissão e disseminação do

agente nos rebanhos, reforçando a importância da vacinação dos animais desse sexo também.

Ainda em relação à reprodução, verifica-se a importância da conscientização dos produtores para adoção de medidas no que se trata da anotação dos dados zootécnicos (abortamentos, natimortalidade, repetição de cio). Uma vez que, por meio deste estudo, verificou-se que, por ser pecuária extensiva e pela grande quantidade de animais na propriedade, muitas vezes não se tem o controle desses dados, e por não ter informações sobre ocorrências relacionadas à reprodução, o produtor pode não saber que está ocorrendo uma enfermidade infecciosa. Desta forma, por não adotar as medidas de prevenção e controle em relação às doenças, podem ocorrer prejuízos econômicos em decorrência da negligência em relação à verificação e à anotação dos dados zootécnicos e da real condição do rebanho.

Desta forma, a associação entre a pesquisa de novas sorovariedades infectantes, a adição de novas estirpes na coleção de antígenos utilizados na rotina para pesquisa de *Leptospira* spp., a adição de estirpes brasileiras circulantes nos rebanhos às vacinas comerciais e a adoção de medidas profiláticas, principalmente em relação à vacinação de machos e fêmeas, em conjunto, poderão auxiliar no controle da infecção. A doença ainda é endêmica em animais de diversas espécies no Brasil, e na bovinocultura ainda é responsável por problemas de ordem reprodutiva em muitos rebanhos, logo a associação das medidas citadas anteriormente poderá auxiliar e tornar a pecuária mais rentável e segura.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Bacterioses y micosis. 3ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, v.1, 2001. 416p.

ADLER, B.; DE LA PENÃ MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n.3-4, p. 287-296, 2010.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; DIB, C. C.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; RODRIGUEZ, C. A. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAES, Z. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Anticorpos contra agentes bacterianos e virais em suínos de agricultura familiar do município de Monte Negro, RO. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.4, p.415-419, 2006a.

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. Seroprevalence of *Leptospira* spp in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.2, p. 102-104, 2006b.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. C. R.; PINTER, A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.70-76, 2007.

AHMED, N.; MANJULATA, D. S.; VALVERDE, M.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 28, p. 1-10. 2006.

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

BARRÊTO JÚNIOR, R. A.; DINO, T. O. R.; MEDEIROS, L. P. M.; REIS, A. G.; SILVA, J. B. A.; QUEIROZ, G. F. Pesquisa de aglutininas antileptospira em bovinos leiteiros do município de Mossoró – RN. **Ars Veterinaria**, v. 21, n. 3, p. 320-323, 2005.

BORLACHENCO, N. G. C.; GONÇALVES, A. B. Expansão agrícola: elaboração de indicadores de sustentabilidade nas cadeias produtivas de Mato Grosso do Sul. **Interações (Campo Grande)**, v.18, n.1, p. 119-128, 2017.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação, SINAN**, 2015. Disponível em: < <http://portalsinan.saude.gov.br/o-sinan>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.4, p.294-300, 2005.

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

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

CASTRO, V.; AZEVEDO, S. S.; GOTTI, T. B.; BATISTA, C. S. A.; GENTILI, J.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. E. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina, Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.6, p.1438-1442, 2009.

CHIARELI, D.; MOREIRA, E. C.; GUTIÉRREZ, H. O. D.; RODRIGUES, R. O.; MARCELINO, A. P.; MENESES, J. N. C.; ALMEIDA, V. M. A. Frequência de

aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em equídeos, em Minas Gerais, 2003 a 2004. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.60, n.6, p. 1576-1579, 2008.

CHIARELI, D.; COSATE, M. R.V.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; LOBATO, F. C. F.; SILVA, J. A.; TEIXEIRA, J. F. B.; MARCELINO, A. P. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.7, p. 633-639, 2012.

COELHO, É. L. M.; CHAVES, N. P.; SÁ, J. C.; MELO, S. A.; SILVA, A. L. A. Prevalência de leptospirose em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos no município de São Luís, MA. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 2, p. 111-115, 2014.

COLEMAN, T. J. The Public Health Laboratory Service (PHLS) and its role in the control of zoonotic diseases. **Acta Tropica**, v.76, n.1, p.71-75, 2000.

CORREA, M. O.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; GALVÃO, P. A. A.; AGUIAR, H. A. Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 25/27, p. 11-25, 1965/1967.

DE PAULA, C. D. **Dinâmica populacional da leptospirose em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de vida livre**. 2003. 65f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

DEL FAVA, C.; VASCONCELLOS, S. A.; D'ANGELINO, J. L.; MORAIS, Z. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.; OLIVEIRA, J. V.; REICHERT, R. H. Coeficientes reprodutivos e soropositividade para *Leptospira* spp. em um rebanho bovino de corte no Estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 20, n. 1, p. 52-061, 2004.

ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. **The Veterinary Record**, v. 110, p. 178-180, 1982.

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

ESTEVES, F. M.; GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R. J. S.; SILVA-VERGARA, M. L.; CARVALHO, A. C. F. B. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e

funcionários do zoológico municipal de Uberaba, MG. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.283-288, 2005.

FAINE, S. *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA, 353p, 1993.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. 2nd ed. World Health Organization, Genève. 171p. 1982

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

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

FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M.; OSÓRIO A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.5, p. 375-381, 2009.

FREITAS, D. C.; VEIGA, J. S.; LACERDA JÚNIOR, P. M. G.; LACERDA, J. P. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo**, v. 6, n. 1, p. 81-84, 1957.

GENOVEZ, M. E. Leptospirose: uma doença de ocorrência além da época das chuvas!. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.1, p.1-3, jan./jun., 2009.

GENOVEZ, M. E.; ESCÓCIO, C.; CASTRO, V.; GABRIEL, F. H. L.; CHIEBAO, D. P.; AZEVEDO, S. S. Fatores de risco associados à infecção pela *Leptospira* spp. sorovar hardjo em rebanhos exclusivos de ovinos e nos consorciados com bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.4, p.587-592, out./dez., 2011.

GENOVEZ, M. E. Leptospirose em Animais de Produção. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap 35, p. 378-387.

GIORGI W.; GENOVEZ M. E.; TERUYA J. M.; SILVA A. S. *Leptospira interrogans*, sorotipo Wolffi, isolada de camundongo capturado no porto de Santos, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 50, n. 12, p. 295-297, 1984.

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; MARCHIORI FILHO, M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.165-169, 2004.

HASHIMOTO, V. Y.; GARCIA, J. L.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, F. G.; ALVES, L. A.; FREITAS, J. C. Prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos, caninos, equinos, ovinos e suínos do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.521-524, 2010.

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE, M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012.

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; CHIDEROLI, R. T.; BARBARA, J. C. A.; BRUNHARO, T. B.; DUTRA, L. H.; SILVA, M. C. P.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Situação epidemiológica da leptospirose bovina no Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 4341-4356, 2015.

HENRY, R. A.; JOHNSON, R. C. Distribution of the genus *Leptospira* in soil and water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, p. 492-499, 1978.

HERRMANN, G. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; HADDAD, J. P. A.; RESENDE, J. R.; RODRIGUES, R. O.; LEITE, R. C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.443-448, 2004.



HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAES, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 173-180, 2001.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, **Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2015.

ITO, F. H.; VASCONCELOS, S. A.; BERNARDI, F.; NASCIMENTO, A. A.; LABRUNA, M.B.; ARANTES, I.G. Evidência sorológica de brucelose e leptospirose e parasitismo por ixodídeos em animais silvestres do Pantanal Sul-Matogrossense. **Ars Veterinaria**, v.13, p. 302-310, 1998.

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

JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; JAYME, V. S.; DA SILVA, L. A. F.; SERENO, J. R. B.; COSTA, G. L.; ABUD, L. J.; MAGGIOLI, M. F. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Leptospira interrogans* em bovinos da raça Curraleiro Pé Duro. **Actas Iberoamericanas em Conservación Animal**, v.7, p. 16-23, 2016.

KIKTENKO, V. S.; BALASHOV, N. G.; RODINA V. N. Leptospirosis infection through insemination of animals. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology**, v. 21, n. 2, p. 207-13, 1976.

LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada (CRMV)**, v.2, n.1, p. 52-58, 1999.

LANGONI H.; MEIRELES L. R.; GOTTSCHALK S.; SILVA, A. V. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, n.1, p.37-41, 2000.

LENHARO, D. K.; SANTIAGO, M. E. B.; LUCHEIS, S. B. Avaliação sorológica para leptospirose em mamíferos silvestres procedentes do parque zoológico municipal de Bauru, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.3, p.333-341, 2012.

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

LILENBAUM, W.; SOUZA, G. N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Research Veterinary Science**, v. 75, p. 249-251, 2003.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; RISTOW, P.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, v.87, n. 1, p.16-19, 2009.

LINS, Z. C.; LOPES, M. L. Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in Amazonian Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 124-126, 1984.

LINS, Z.C.; SANTA ROSA, C.A. Investigações epidemiológicas preliminares sobre leptospiroses em Humboldt, Aripuanã, Mato Grosso. **Acta Amazônica**, v. 6, n. 4, p. 46-53. 1976.

LOUREIRO, A.P.; MARTINS, G.; PINTO, P.; NARDUCHE, L.; TEIXEIRA, R.C.; W. LILENBAUM. Usage of a selective media (EMJH-STAFF) in primary culturing of pathogenic leptospires from bovine clinical samples. **Applied Microbiology**, v. 61, n.6, p. 603-606, 2015.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospirosis from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro – Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 249-253, 2016.

MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, J. M. B.; SILVA JÚNIOR, J. L.; ASSIS, N. A.; BRANDESPIM, D. F.; MATHIAS, L. A.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Epidemiologic analysis of *Leptospira* spp. infection among sheep in Pernambuco state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p. 1-7, 2016.

MAGAJEVSKI, F. S.; GÍRIO, R. J. S.; MEIRELLES, R. B. Pesquisa de leptospira em fetos de vacas abatidas no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p.67-72, 2007.

MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINNA, M. H.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n.7, p. 1538-1541, 2014.

MARVULO, M. F. V.; PAULA, C. D.; FERREIRA P. M.; MORAIS, Z. M.; DELBEM, A. C. B.; FAVERO, A. C. M.; MIRAGLIA, F.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E.; FERRAZ, E.; PENTEADO, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **Anais. Bridgetown: International Leptospirosis Society**, 2002.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1103-1109, 2007.

MINEIRO, A. L. B. B.; VIEIRA, R. J.; FEITOSA, L. C. S.; BEZERRA, E. E. A.; COSTA, F. A. L. Pesquisa de sorovares de leptospiros em rebanho bovino leiteiro no Estado do Piauí, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.129-132, 2010.

MIRANDA, F. R.; SUPERINA, M.; VINCI, F.; HASHIMOTO, V.; FREITAS, J. C.; MATUSHIMA, E. R. Serosurvey of *Leptospira interrogans*, *Brucella abortus* and *Chlamydophila abortus* infection in free-ranging giant anteaters (*Myrmecophaga gattidactyla*) from Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 462-465, 2014.

MORAIS, M. H. F. **Isolamento de *Leptospira hardjo* em rebanho bovino com problemas de reprodução**. 59f. 1994. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

MORENO, L. Z.; LOUREIRO, A. P.; MIRAGLIA, F.; MATAJIRA, C. E. C.; KREMER, F. S.; ESLABAO, M. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; LILENBAUM, W. MORENO A. M. Draft genome sequence of Brazilian *Leptospira noguchii* serogroup Panama strain U73, isolated from cattle. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. 1- 2, 2015.

NEGRÃO, A. M. G.; MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L. Leptospirose em bovinos abatidos em matadouros no Estado do Pará. **Revista Científica Ciências Agrárias**, v. 33, p.77-86, 2000.

OIE. **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals.** 2001. Disponível em: <www.oie.int>. Acesso em: 26/06/2014

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.5, p.398-402, 2010.

OLIVEIRA, R. M.; SILVA, M. L. C. R.; MACÊDO, M. M. S.; HIGINO, S. S. S.; PAULIN, L. M.; ALVES, C. J.; CARVALHO, M. G. X.; AZEVEDO, S. S. Soroepidemiologia da leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar do agreste paraibano, Nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.3, p. 303-311, 2013.

PAES, A. C. Leptospirose Canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap 34, p. 356-377.

PELLEGRIN, A. O.; GUIMARÃES, P. H. S.; SERENO, J. R. B.; FIGUEIREDO, J. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C. **Prevalência da leptospirose em bovinos do pantanal mato-grossense**. Campo Grande: Embrapa: Pantanal, 1999, 9p. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 22).

PIMENTA, C. L. R. M.; CASTRO, V.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; FERNANDES, L. G.; BRASIL, A. W. L.; SANTOS, C. S. A. B.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 332-336, 2014.

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.

R CORE TEAM (2013). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

ROLIM, M. B. Q.; BARROS, S. E. M.; SILVA, V. C. L.; SANTANA, V. L. A.; SOUZA, M. A.; HARROP, M. H. V.; MOTA, R. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MOURA, A. P. B. L.;

LIMA, P. F. Determinação de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella abortus* em bovinos abatidos em matadouro público no Estado de Pernambuco. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v.7, n.1, p.24-30, 2013

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; TROISE, C. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 28, p. 113-118, 1961.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; CASTRO, A. F. P.; YANAGUITA, R. M.; GIORGI, W. Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis group isolated from cattle in Brazil. **International Journal of Zoonoses**, v. 7, p. 158-163, 1980.

SANTOS, R. F.; SILVA, G. C. P.; ASSIS, N. A.; MATHIAS, L. A. Agglutinins to *Leptospira* spp. in equines slaughtered in the southern region of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 2, p. 841-852, 2016.

SARMENTO, A. M. C.; AZEREDO, S. S.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; OLIVEIRA, F. C. S.; GONÇALVES, A. P.; MIRAGLIA, F.; VASCONCELLOS, S. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 601-606, 2012.

SILVA, E. F.; SEYFFERT, N.; JOUGLARD, S. D. D.; ATHANAZIO, D. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; BROD, C. S. Soroprevalência da infecção leptospiral em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) abatidas em um frigorífico do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p.174-176, 2009.

SILVA, F. J.; CONCEIÇÃO, 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n. 4, p. 303-312, 2012.

SILVA, F. J. **Epidemiologia da infecção por *Leptospira* spp. em áreas rurais nos biomas brasileiros**. 2014. 154f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2014.

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

SMITH, C. E.; TURNER, L. H. The effect of pH on the survival of leptospires in water. **Bull World Health Organ**, v. 24, p.35-43, 1961.

SULZER, K.; POPE, V.; ROGERS, F. New leptospiral serotypes (serovars) from the Western Hemisphere isolated during 1964 through 1970. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 24, p. 15-17, 1982.

TABATA, R. **Proteção cruzada entre bacterinas antileptospirose produzidas com três representantes do sorogrupo Sejroe. Ensaio experimental em Hamsters (*Mesocricetus auratus*)**. 2002. 70f. Dissertação (Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

THIERMANN, A. B. Canine leptospirosis in Detroit. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 10, p. 1659-1661, 1980.

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

THRUSFIELD, M.V. **Epidemiologia Veterinária**, 3ª ed. São Paulo, 2010. p.556.

TONIN, A. A.; AZEVEDO, M. I.; ESCOBAR, T. P.; CASASSOLA, I.; SANTOS, L. G.; SILVA, A. S.; MARTINS, J. L. R.; SCHAEFER, 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.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose animal. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** p. 62-66.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JUNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FAVERO, A. C. M.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, n. 2, p. 7-15. 1997.



VIANA, K. F.; ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Caparaó, Estado do Espírito Santo. **Archives of Veterinary Science**, v.15, n.2, p.100-106, 2010.

VIEIRA, A. S. **Levantamento de *Leptospira* spp. em animais silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares.** 2009. 83f. 83f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência Animal). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

VIEIRA, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; OLIVEIRA, C. E.; VASCONCELLOS, S. A.; BORGES, P. A. L.; TOMÁS, W. M.; MOURÃO, G. M.; LACERDA, A. C. R.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; PIOVEZAN, U.; ZUCCO, C. A.; PELLEGRIN, A. O. Survey of *Leptospira* spp. in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Pantanal wetlands of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil by serology and polymerase chain reactions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 763-768, 2011.

VIEIRA, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; VIANA, R. C.; OLIVEIRA, C. E.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; MOURÃO, G. M.; BIANCHI, R. C.; OLIFIERS, N.; MARTINS, V. R.; ROCHA, F. L. Identificação de mamíferos silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense portadores de *Leptospira* spp. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 373-380, 2013.

YANAGUITA, R. M. **Contribuição ao estudo da leptospirose bovina, isolamento de dois novos sorotipos no sorogrupo Hebdomadis: sorotipos guaicuris e goiano.** 1972. 71f. Tese (Doutorado em Doença Animal) Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

ZACARIAS, F. G. S.; VASCONCELLOS, S. A.; ANZAI, E. K.; GIRALDI, N.; FREITAS, J. C.; HARTSKEERL, R. Isolation of leptospira serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 744-748, 2008.