

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

***Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM FETOS E OÓCITOS
COLHIDOS DE VACAS NO MOMENTO DO ABATE.**

Fernanda Senter Magajevski

Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Gírio

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 (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2007

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As técnicas de inseminação artificial (IA), produção de embriões “in vitro” (PIV) e transferência de embriões (TE) foram passos fundamentais para melhor rendimento e qualidade de rebanhos bovinos em todos os continentes, propiciando bons resultados econômicos para a pecuária mundial. As tecnologias de embriões são uma combinação de assistência reprodutiva, biologia celular e molecular e técnicas genômicas (GALLI et al., 2003), porém de nada adianta investir em tais tecnologias em rebanhos ou animais atingidos por problemas sanitários, com enfermidades que podem ser transmitidas pelo sêmen, por oócitos e por embriões, que provocam, entre outros males, infertilidade, abortamentos, repetição de cio e, até mesmo, esterilidade. Entre as enfermidades da esfera reprodutiva, destacam-se, neste trabalho, a leptospirose e a brucelose.

A leptospirose é considerada uma das principais enfermidades da esfera reprodutiva, causando principalmente abortamentos, infertilidade, ocorrência de natimortos e retenção placentária, participando como uma das grandes responsáveis pela baixa produtividade da pecuária nacional e mundial (GIVENS, 2006). Além da importância na área de saúde animal, a leptospirose assume papel relevante do ponto de vista de Saúde Pública, uma vez que o contato com animais infectados é uma importante via de transmissão para o homem (MICHNA, 1970; AMATREDJO et al., 1975; HIGGINS et al., 1980).

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

técnica de absorção cruzada de aglutininas, executada por laboratórios de referência (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985). Em 1992, o Subcomitê de Taxonomia de *Leptospira* propôs uma nova divisão para esse gênero, o qual é formado atualmente por oito genomoespécies patogênicas: *L. borgptersenii*, *L. interrogans sensu stricto*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. inadai* e *L. fainii*, distribuídas em 26 sorogrupos e 250 sorovares, e três genomoespécies saprófitas, ou de vida livre: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, com raros registros de infecções (KMETY & DIKKEN, 1993).

A transmissão da *Leptospira* spp. na espécie bovina pode ocorrer de forma indireta, pelo contato com água e solos contaminados, e pelo modo direto, principalmente pela via venérea (AMATREDJO et al., 1975). A transmissão transplacentária também é comum entre os animais (BRASIL, 1995). Uma vez infectados, os bovinos eliminam o agente na urina por um período de tempo variável, que pode chegar a mais de um ano (HANSON, 1982; THIERMANN, 1984); a leptospiúria em bovinos pode persistir entre dez dias e quatro meses, tendo caráter intermitente (REBHUN, 1995).

JONES (1958) verificou que a leptospirose poderia ser disseminada nos rebanhos por meio do sêmen contaminado, durante a monta natural e a IA. Essa possibilidade de transmissão venérea foi confirmada por ROBERTS (1958) e SLEIGHT & WILLIAMS (1961).

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

Atualmente, utilizam-se as técnicas de biologia molecular nas pesquisas de leptospirosas em sêmen e outros materiais. HEINEMANN et al. (1999) utilizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar leptospirosas em sêmen, encontrando DNA desse agente em amostras provenientes de animais soropositivos e soronegativos.

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

Outras técnicas de detecção de leptospiros muito utilizadas são as técnicas de coloração como a Levaditi e a imunoistoquímica. BRANDESPIM et al. (2004) utilizaram as duas técnicas para detecção de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em órgãos do aparelho reprodutor de hamsters experimentalmente infectados e concluíram que, embora as duas sejam técnicas recomendadas, a técnica de Levaditi apresentou melhores resultados.

São muitos os trabalhos referentes às perdas reprodutivas causadas pela leptospirose em vacas. GUIMARÃES (1982) descreve que os danos causados pela *L. interrogans* em bovinos, nas suas fases aguda e crônica, são caracterizados principalmente por abortamento, infertilidade, retenção placentária, queda na produção de leite, mastite e parasitismo renal permanente.

ELLIS et al. (1982) examinaram fetos bovinos abortados e detectaram que em 41,6% havia a presença do sorovar Hebdomadis e constataram que 68% desses fetos eram provenientes de propriedades com problemas reprodutivos.

KOLEV et al. (1983) investigaram 231 amostras de sangue de vacas que haviam abortado, dado à luz bezerras mortas ou que apresentaram falhas na concepção, revelando que 15,58% dos casos foram causados por vírus e 6,06% por leptospiros. Nesse trabalho, foi demonstrada a conexão etiológica entre distúrbios reprodutivos e qualidade sanitária do rebanho, dando-se atenção especial a viroses e à leptospirose.

ELDER et al. (1985) investigaram a relação entre abortamentos e títulos de anticorpos antileptospira em rebanhos bovinos de leite e corte. Os títulos sorológicos encontrados foram significativamente relacionados com essa alteração reprodutiva, e o sorovar Pomona foi considerado mais freqüente que o Hardjo.

ELLIS et al. (1986) detectaram a presença do sorovar Hardjo no útero, nas tubas uterinas, nos ovários e na vagina de vacas não prenhes, infectadas experimentalmente. De 60 vacas examinadas, 39 (65%) apresentaram esse sorovar no trato genital, e 35 (62%), nas vias urinárias.

KIRKBRIDE et al. (1989) testaram 773 soros fetais bovinos e observaram que 52 foram positivos à prova de SAM para pelo menos um dos cinco sorovares de leptospira utilizados. Pelo teste com anticorpo fluorescente, não foi detectada leptospira nos fetos que apresentaram título de anticorpos, porém, por essa técnica, a leptospira foi detectada em 15 bezerros abortados, mas que foram negativos na SAM.

GÍRIO et al. (1990), com o objetivo de investigar a associação entre leptospirose bovina e determinados parâmetros reprodutivos, como intervalo entre partos, número de partos e número de serviços por concepção, estudaram 233 fêmeas e verificaram que não houve relação significativa entre os animais reagentes contra os sorovares Wolffi, Pomona, Hardjo e Icterohaemorrhagiae e as alterações reprodutivas.

MOREIRA et al. (1993), em um surto de leptospirose bovina no Estado de Minas Gerais, verificaram que a ocorrência de abortamento, mastite, morte fetal e infertilidade foi mais freqüente nos animais que apresentaram aglutininas contra os sorovares Hardjo e Wolffi.

No período de 1985 a 1992, foram analisadas bacteriologicamente, no Instituto Biológico de São Paulo, 544 amostras de órgãos e anexos fetais de 282 fetos bovinos abortados em vários estados brasileiros, sendo a leptospirose e a brucelose consideradas como causa em 12,4% dos casos (GENOVEZ et al., 1993).

DHALIWAL et al. (1996) estudaram a importância do sorovar Hardjo no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras de diferentes rebanhos com leptospirose. Concluíram que esse sorovar pode causar alterações na reprodução, provocando principalmente casos de abortamento e queda de fertilidade.

Em um estudo com 356 vacas que pariram natimortos ou animais com síndrome do bezerro debilitado, verificou-se que nos animais em que foram detectadas leptospirosas na placenta houve um emagrecimento de seis a dez quilogramas de peso corporal, o que não se observou nas vacas com placenta negativa; além disso, as

vacas com placenta positiva estavam mais susceptíveis a outras infecções por agentes como *Actinomyces pyogenes* e *Bacillus sp.* Nesse trabalho, em 8,9% das placentas examinadas foi detectado antígeno de leptospira (SMYTH et al., 1999).

Ao analisar 120 amostras de soro sanguíneo de vacas que abortaram, e os rins dos fetos abortados, LANGONI et al. (1999) isolaram *Leptospira* spp. de 15 fetos, e outros 57 fetos apresentavam evidências histológicas de infecção por *Leptospira* spp.. Vinte e sete das 120 vacas apresentaram sorologia positiva para leptospirose.

GUITIÁN et al. (2001) realizaram um estudo sorológico de prevalência de infecção por leptospira entre vacas leiteiras com desenvolvimento reprodutivo deficiente na Galícia – Espanha, observando que 81 (18,33%) de 442 vacas foram positivas na prova de SAM.

Um estudo da prevalência de leptospirose realizado com 31.325 bovinos de 21 estados brasileiros, no período de 1984 a 1994, mostrou que o sorovar Hardjo era o mais provável em todos os estados analisados, variando de 100% a 33,3%, e que no Estado de São Paulo 79,9% das propriedades avaliadas apresentavam casos da doença (FAVERO et al., 2001). A predominância do sorovar Hardjo em rebanhos das regiões sul e sudeste do Brasil foi também verificada por VASCONCELLOS et al., em 1997.

Entre 95 fetos abortados no sétimo mês de gestação, cinco (5,2%) apresentaram anticorpos contra *Leptospira* spp. em rebanhos leiteiros e de corte dos pampas argentinos (MOORE et al., 2003).

No Estado brasileiro de Minas Gerais, Araújo et al. (2005) pesquisaram a presença de aglutininas antileptospira em 39.012 amostras de soro sanguíneo bovino, encontrando uma maior frequência do sorovar Hardjo (57,2%), seguido pelo sorovar Wolffi (13,2%), e consideraram que a infecção por *Leptospira interrogans* é endêmica em bovinos no Estado em questão.

No norte da Espanha, um estudo com vacas leiteiras de baixa fertilidade mostrou um percentual de 25,4% de animais sororreagentes para o sorovar Bratislava, seguido dos sorovares Hardjo (8,2%), Pomona (7,7%), Autumnalis (0,7%) e Copenhageni (0,1%), e um significativo número de abortamentos entre as fêmeas com títulos iguais ou superiores a 300 (ATXAERANDIO et al., 2005).

Quanto aos antibióticos, há relatos na literatura comprovando que as leptospirosas podem suportar as concentrações empregadas no processo de congelamento, com ou sem redução em sua virulência (HOAG & BELL, 1955; BLENDEN, 1975; BRYAN & BOLEY, 1975).

HAFEZ (1995) descreveu que uma combinação de penicilina entre 50 e 100 UI/mL e estreptomicina entre 500 e 1.000 UI/mL proporciona um largo espectro de atividade antibacteriana. MIRAGLIA (2001), comparando a capacidade de quatro antibióticos, acrescidos ao diluidor de sêmen gema-citrato, concluiu que a associação penicilina-estreptomicina apresentou os melhores resultados na capacidade de destruir leptospirosas, mas houve 2,0% (7/348) de cultivos positivos para leptospirosas. Amoxicilina, ceftiofur sódico e a combinação de ambos, nas concentrações de 1.000 µg/mL, não foram efetivos para inativar as leptospirosas.

A brucelose é outra enfermidade muito importante quando se trata de eficiência reprodutiva. O agente etiológico pertence ao gênero *Brucella*, podendo ser dividida em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e as rugosas (*B. ovis* e *B. canis*). A *B. abortus* subdivide-se em sete biotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19), a *B. melitensis* em três (1, 2 e 3), e a *B. suis* em cinco (1, 2, 3, 4 e 5). As rugosas, embora apresentem variantes, não se subdividem em biotipos (PAULIN & FERREIRA, 2003). A *B. melitensis* não foi isolada no Brasil, sendo considerada exótica em nosso país (POESTER, 2002). A espécie *Brucella abortus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY, 1988) é o agente da brucelose bovina, e o biovar 1 é o mais difundido, ocorrendo praticamente no mundo todo (ACHA & SZYFRES, 2001).

As vacas constituem a categoria mais suscetível à brucelose, principalmente aquelas em gestação. Os touros também são suscetíveis, porém são mais resistentes que as fêmeas. Além da idade e do sexo, existe variação de suscetibilidade individual, pois existem animais que não são infectados, mesmo em rebanhos com elevada taxa de prevalência (ACHA & SZYFRES, 2001).

A brucelose está freqüentemente associada à retenção de placenta, metrites e um subsequente período de infertilidade, prejudicando seriamente o desempenho reprodutivo do rebanho. Afeta aproximadamente 5% dos rebanhos de todo mundo, e,

embora já esteja erradicada em vários países desenvolvidos, continua ocorrendo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (DEL CAMPO et al., 1987; EAGLESOME & GARCIA, 1997).

Estudando a distribuição anatômica da *Brucella* em diferentes órgãos de vacas infectadas natural e experimentalmente, CORNER et al. (1987) observaram que os locais de predileção foram os nódulos linfáticos supramamários, mas também foi encontrada *Brucella* spp. em outras regiões, como carúnculas e cotilédones uterinos, assim como em tecidos fetais.

Em 1984, LÓPEZ et al. publicaram um artigo indicando que o número de fetos abortados de vacas brucélicas apresentando lesão hepática era significativamente maior ($p < 0,05$) que em fetos provenientes de vacas soronegativas.

HONG et al. (1991) analisaram fetos bovinos abortados infectados por *Brucella abortus*. As alterações patológicas encontradas foram lesões granulomatosas e necroses focais em vários órgãos, edema subcutâneo, lesões sero-hemorrágicas nas cavidades corporais e broncopneumonia ou pneumonia intersticial, além de vasculite, pleurite fibrinosa, meningite e conteúdo estomacal anormal.

CORTEZ et al. (2001) concluíram que a extração de DNA, em conteúdo estomacal e órgãos fetais, pode ser realizada pela fervura, sem prejuízos em relação ao resultado final da extração de DNA com proteinase K. CORTEZ e colaboradores consideraram a PCR um instrumento a mais para o diagnóstico de brucelose em fetos, uma vez que resultados negativos no cultivo não são garantia de ausência de infecção por *Brucella*.

Estudiosos como BARRIOS et al., 1987; DEL CAMPO et al., 1987; STRINGFELLOW & WRIGHT, 1989, encontraram resultados que afastam a possibilidade de transmissão de brucelose por meio de transferência de embriões. No entanto STRINGFELLOW et al. (1986) isolaram *Brucella abortus* de embriões com a zona pelúcida defeituosa, após um período de exposição e dez lavagens sequenciais sem antibiótico, e RIDDELL et al. (1990) isolaram *B. ovis* de embriões ovinos, indicando que havia organismos viáveis aderidos a esses embriões, e as fêmeas que receberam esses embriões passaram a produzir anticorpos contra brucela.

Embora a brucelose seja um dos principais problemas sanitários do rebanho bovino brasileiro, há pouca informação segura sobre a taxa de prevalência da enfermidade ao longo do território nacional.

Entre os poucos dados sobre a ocorrência de brucelose bovina, obtidos com o necessário planejamento, pode ser citado um inquérito sorológico nacional realizado pelo Ministério da Agricultura em 1975. Na prova de soroaglutinação em placa, 4,79% de 71.749 animais examinados apresentaram aglutinação a partir da diluição 1/100. Na região Sudeste, de 27.544 animais examinados 7,5% foram reagentes. No Estado de São Paulo foram examinados 6.145 bovinos em 1.550 rebanhos, 6,73% dos animais foram reagentes e 22,7% dos rebanhos tinham animais reagentes (ANSELMO & PAVEZ, 1977).

MURAKAMI (2003) encontrou uma taxa de 2,12% de animais positivos na prova de soroaglutinação em placa, em um estudo realizado em dois municípios da região Nordeste do Estado de São Paulo.

Com a implantação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), vários estudos vem se desenvolvendo no sentido de estimar a prevalência da brucelose em várias regiões do Brasil, porém muitos desses dados ainda não foram publicados; nesse sentido, POMPEI et al. (2002) publicaram um levantamento feito no Estado de São Paulo, envolvendo 8.904 vacas, mostrando uma prevalência de 1,11%.

Poucos estudos foram realizados analisando-se a relação entre a leptospirose e/ou a brucelose e a condição dos embriões. A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões incentivou trabalhos científicos, a maioria no Canadá, sobre o risco de transmissão de enfermidades de animais doadores para animais receptores de embrião na fase de blastocistos com sete dias de formação. Eles obtiveram sucesso ao demonstrar que, com um protocolo apropriado de manejo de embriões, pode-se diminuir a transmissão de doenças tanto virais quanto bacterianas. Também é feita referência ao favorecimento do risco da transmissão de doenças pela manipulação de embriões "in vitro" (PHILPOTT, 1993).

Os oócitos e os embriões de mamíferos possuem um envoltório extracelular glicoprotéico conhecido como zona pelúcida (ZP), que tem a função de assegurar a especificidade das espécies no momento da fertilização, bloquear a poliespermia, assim como proteger o conceito durante os primeiros estágios do desenvolvimento (DUNBAR, 1983). As glicoproteínas que formam a ZP são secretadas pelo oócito em desenvolvimento, pelas células foliculares associadas ao oócito em desenvolvimento e, em alguns casos, pelas células epiteliais que formam o oviduto (DUNBAR, 1983; OIKAWA et al., 1988; WASSARMAN, 1988). Por essas afirmações, fica evidente que o bom estado biológico e sanitário do oócito é fundamental para a formação de uma ZP apropriada e capaz de desempenhar as suas funções primordiais.

Antes da fertilização, a ZP é uma membrana com microporos permeáveis a macromoléculas (SELLENS & JENKINS, 1975), o que é fundamental para a troca de substâncias com o meio exterior durante a maturação, mas que também pode permitir a entrada ou fixação de agentes infecciosos. Além disso, existem canais na ZP que são deixados por células foliculares remanescentes que se desprendem de sua superfície, principalmente logo após a ovulação (GWATKIN, 1967), que podem se tornar importante via de entrada para agentes infecciosos no embrião e/ou oócito. Até o momento, só foi comprovada a entrada de mengovírus (menor RNAvírus) e parvovírus (menor DNAvírus) por esses canais (GWATKIN, 1967; BANE et al., 1990).

STRINGFELLOW et al. (1991) citaram, em trabalho de revisão, autores que descrevem a capacidade de certos agentes conseguirem ou não se fixar à ZP de embriões. Um experimento coletivo mostrou que Akabane vírus (AV), vírus da leucemia bovina (BLV), vírus da língua azul (BTV), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da febre aftosa (FMDV) e *Brucella abortus* não aderem à ZP. Os agentes infecciosos que aderem seriam: herpesvírus-4 bovino (BHV-4), vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBRV), vírus da peste bovina (RPV), vírus da estomatite vesicular (VSV), *Haemophilus sommus*, *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. paratuberculosis* e *Ureaplasma diversum*. O embrião estaria livre do *H. sommus* após tratamento com antibiótico e livre de herpesvírus-4, IBRV e VSV após tratamento com tripsina, embora a eficácia do tratamento com tripsina para remoção de VSV não seja clara. Um outro estudo

semelhante a esse demonstrou que os vírus da doença de Aujeszky, IBR, VSV, BTV e BVDV aderem à ZP, enquanto o enterovírus bovino e o vírus parainfluenza-3 não aderem. Esses resultados são questionáveis, pelo fato de que os embriões passaram por no máximo cinco lavagens ou não receberam lavagem. BOWEN et al. (1985) afirmam que o BTV e o BVDV não estariam aderidos à ZP após 10 lavagens.

BIELANSKI et al. (1998) realizaram um trabalho verificando o estado sanitário de oócitos e embriões coletados de vacas experimentalmente infectadas com leptospira e verificaram que, de 21 amostras de embriões recuperadas, todas se mostraram negativas à infecção por leptospira. No entanto, no mesmo trabalho, utilizando-se a técnica de PCR, mostrou-se que 29% dos embriões em estágio de mórula e blastocistos apresentaram-se positivos, e de 29 oócitos recolhidos, um foi positivo quanto à presença de DNA de leptospira. No mesmo ano, BIELANSKI & SURUJBALLI (1998) publicaram um artigo no qual relataram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, leptospiros aderidas à superfície e aos poros da ZP de embriões no estágio de mórula, e, pela microscopia eletrônica de transmissão, observaram leptospiros na matriz e nos canais da ZP, nos espaços perivitelínicos e intercelulares, nas células embriônicas e vitelínicas, mostrando que pode ser possível a transmissão de leptospiros por meio de transferência de embriões.

2 - JUSTIFICATIVAS

Este trabalho é justificado pela importância da leptospirose e da brucelose como enfermidades que afetam o sistema reprodutor, aliada à escassez de trabalhos que relatem a ação desses agentes nos estágios iniciais da formação embrionária e à necessidade de um controle sanitário mais efetivo em relação a oócitos e embriões, uma vez que vem crescendo a preocupação quanto à qualidade sanitária desses materiais, garantindo mais segurança para o sucesso das técnicas de fertilização “in vitro” (fiv) e de transferência de embriões (TE).

3 – OBJETIVOS

1 - Realizar o cultivo de *Leptospira* spp. a partir de rim, fígado e conteúdo estomacal de fetos de vacas abatidas em frigorífico, comparando os resultados com a sorologia da mãe.

2 - Realizar o cultivo de *Brucella* spp. a partir de conteúdo estomacal, pulmão e baço de fetos de vacas abatidas em frigorífico, comparando os resultados com a sorologia da mãe.

3 - Realizar o cultivo de *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. a partir da placenta das vacas abatidas em frigorífico.

4 - Pesquisar a presença de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. no líquido folicular de ovários bovinos por meio da técnica de PCRm.

5 - Pesquisar a presença de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. no oócito bovino por meio da técnica de PCRm.

6 - Pesquisar a possível localização das leptospiros no oócito bovino, tanto na infecção natural quanto experimental.

7 - Verificar se a utilização de antibióticos no meio de maturação pode proteger o oócito da ação patogênica e da fixação de leptospiros.

8 - Investigar a sensibilidade de oócitos bovinos frente ao contato com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, durante a maturação “in vitro”.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Animais

Foram utilizadas 512 fêmeas bovinas encaminhadas para o abate em um frigorífico¹ localizado na região Nordeste do Estado de São Paulo. Nesse frigorífico são abatidos diariamente, em média, 700 animais, sendo 40% fêmeas; destas, cerca de 30% apresentam-se prenhas, em várias fases de gestação. O frigorífico recebe animais de toda região Norte e Nordeste de São Paulo, além do Sul dos Estados de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Seu produto é destinado a grandes redes de supermercados no Brasil e países como Alemanha, Japão e China.

Das 512 vacas avaliadas, 212 foram utilizadas para a pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nos fetos, e 300 foram utilizadas para pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. no líquido folicular e nos oócitos.

4.2 - Colheita de amostras

Foram realizadas 10 colheitas de material para pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp em fetos (212 vacas e 213 fetos) e 10 colheitas de material para pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp em líquido folicular e oócitos (Quadros 1 e 2)

¹ Inspeccionado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF)

Quadro 1. Datas das colheitas e números de animais abatidos em frigorífico e utilizados para pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em fetos no período de março a junho de 2005 (primeira fase do projeto).

DATA	NÚMERO DE ANIMAIS
01 / 03 / 05	10 vacas 10 fetos
15 / 03 / 05	10 vacas 10 fetos
06 / 04 / 05	14 vacas 15 fetos (uma gestação gemelar)
07 / 04 / 05	18 vacas 18 fetos
12 / 04 / 05	28 vacas 28 fetos
13 / 04 / 05	28 vacas 28 fetos
05 / 05 / 05	18 vacas 18 fetos
10 / 05 / 05	26 vacas 26 fetos
12 / 05 / 05	25 vacas 25 fetos
08 / 06 / 05	35 vacas 35 fetos
TOTAL DE ANIMAIS	212 vacas e 213 fetos

Quadro 2. Datas das colheitas e números de vacas abatidas em frigorífico e utilizadas para pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em líquido folicular e oócitos no período de agosto a novembro de 2005 e setembro a novembro de 2006 (segunda fase do projeto).

DATA	NÚMERO DE ANIMAIS
16 / 08 / 05	30 vacas
24 / 08 / 05	30 vacas
31 / 08 / 05	30 vacas
26 / 10 / 05	30 vacas
10 / 11 / 05	30 vacas
19 / 09 / 06	30 vacas
26 / 09 / 06	30 vacas
17 / 10 / 06	30 vacas
24 / 10 / 06	30 vacas
08 / 11 / 06	30 vacas
TOTAL DE ANIMAIS	300 vacas

4.2.1 - Amostras de sangue

No momento do abate, foi colhido sangue arterial (carótida) de vacas gestantes ou não, e de seus respectivos fetos (intracardíaco). O sangue colhido foi dessorado, e o soro foi identificado e encaminhado para o exame sorológico. Para o diagnóstico de leptospirose foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), e para brucelose, a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), confirmada pelo teste do mercaptoetanol (2-ME). A partir dos resultados da sorologia das vacas foram separados os grupos para a pesquisa dos agentes nos fetos, nos líquidos foliculares e nos oócitos.

4.2.2 - Fetos e placenta

As 212 fêmeas prenhes foram identificadas, e suas placentas, contendo seus respectivos fetos, foram amarradas e identificadas com a mesma numeração antes de serem enviadas para a sala de fetos. Nessa sala, os fetos marcados foram recolhidos, amostras de cinco a sete mililitros de conteúdo estomacal foram colhidas em seringas de 10 mL, e fragmentos de seis a oito gramas de pulmão, baço, rim e fígado foram armazenados em coletores universais esterilizados. Todos os materiais foram mantidos sob refrigeração em caixas térmicas e enviados para o laboratório em um período máximo de três horas. Esses materiais foram cultivados em meios próprios para o crescimento de *Leptospira* ssp. e *Brucella* ssp. e analisados pela técnica de PCR multiplex (PCRm) para *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. Cultivos com crescimento de colônias suspeitas foram submetidos à PCRm para confirmação.

Fragmentos, de seis a oito gramas, das placentas das vacas foram submetidas ao mesmo procedimento que os órgãos fetais acima mencionados.

A idade dos fetos foi estimada a partir de medidas tomadas no sentido crânio-caudal e aplicadas à fórmula proposta por REXROAD et al. (1974).

4.2.3 - Ovários

Os ovários de 300 vacas abatidas em frigorífico foram armazenados individualmente em coletores universais esterilizados contendo cerca de quatro a cinco mililitros de solução salina esterilizada (0,9%), e mantidos à temperatura média de 36°C por um período máximo de seis horas⁹ até o momento da punção dos folículos para retirada do líquido folicular e seleção dos oócitos. O líquido folicular foi submetido ao mesmo tratamento dos materiais do item anterior (PCRm e cultivo) e os oócitos selecionados foram maturados por 24 horas, sendo então submetidos ao PCRm e as técnicas de coloração de Levaditi e de imunoistoquímica.

4.3 - Teste sorológico para diagnóstico de leptospirose

4.3.1 – Técnica de soroaglutinação microscópica

Os soros sangüíneos foram diluídos em solução tamponada de Sørensen (Anexo), segundo SANTA ROSA (1970), sendo a diluição inicial de 1/25 para os soros das fêmeas e 1/5 para os soros dos fetos. Dessa diluição, alíquotas de 50 µL foram colocadas em placas de poliestireno, com fundo em formato de U, e adicionada igual quantidade de antígeno, de 24 variantes antigênicas de leptospira (Quadro 3), resultando na diluição de 1/50 para os soros sangüíneos das fêmeas e 1/10 para os fetos. A mistura soro-antígeno foi levemente agitada e incubada em estufa bacteriológica à temperatura de 28°C por duas horas, procedendo-se a seguir à leitura em microscopia de campo escuro, com objetiva de 40x e ocular de 15x, colocando-se uma gota da mistura soro-antígeno na superfície de lâminas de vidro tamanho 26x76 mm. O critério adotado para considerar um soro como reagente foi o de 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospiplas aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. Os soros reagentes na triagem inicial foram reexaminados com

⁹ Manual de procedimentos para produção *in vitro* de embriões bovinos - Departamento de reprodução animal, FCAV - Unesp, Campus de Jaboticabal.

sete diluições seriadas de razão dois. O título do soro foi considerado a recíproca da sua maior diluição que apresentou pelo menos 50% de aglutinação.

Quadro 3. Estirpes de *Leptospira interrogans* empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo o sorogrupo e o sorovar.

Sorogrupo	Sorovares
<i>Australis</i>	Australis
<i>Australis</i>	Bratislava
<i>Autumnalis</i>	Autumnalis
<i>Autumnalis</i>	Butembo
<i>Ballum</i>	Castellonis
<i>Bataviae</i>	Bataviae
<i>Canicola</i>	Canicola
<i>Celledoni</i>	Whitcombi
<i>Cynopteri</i>	Cynopteri
<i>Grippotyphosa</i>	Grippotyphosa
<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Copenhageni
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Icterohaemorrhagiae
<i>Javanica</i>	Javanica
<i>Panama</i>	Panama
<i>Pomona</i>	Pomona
<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes
<i>Sejroe</i>	Hardjo
<i>Sejroe</i>	Wolffi
<i>Shermani</i>	Shermani
<i>Tarassovi</i>	Tarassovi
<i>Andamana</i>	Andamana
<i>Seramanga</i>	Patoc
<i>Djasiman</i>	Sentot

4.4 - Testes sorológicos para diagnóstico de brucelose

4.4.1 – Prova do antígeno acidificado tamponado

Esse método, também conhecido como teste rosa Bengala e “card test”, foi realizado segundo a técnica recomendada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

O método consiste em colocar 0,03 mL do soro em contato com 0,03mL do antígeno, em uma placa de vidro, homogeneizar e manter a placa em movimentos rotatórios constantes até o momento da leitura, que é feita após 4 minutos de reação, observando-se a ocorrência dos grumos de aglutinação. O antígeno empregado nessa técnica foi preparado com *Brucella abortus* amostra 1.119/3, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), na concentração de 8% de volume celular, pH 3,63 e corado pelo rosa de Bengala.

4.4.2 - Prova do mercaptoetanol

Foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

Empregou-se antígeno de célula total (antígeno para soroaglutinação lenta), preparado com *Brucella abortus* amostra 1.119/3, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), na concentração final de 0,045% de volume celular.

Utilizou-se como diluente solução salina 0,85%, com uma concentração final de 0,78% de 2-mercaptoetanol.

Os soros foram testados em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com volume final de 2mL da mistura diluente-soro-antígeno.

Fez-se a leitura após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação.

O teste do mercaptoetanol foi incubado e lido junto com o teste de soroaglutinação (lenta) em tubos.

4.4.3 - Teste de soroaglutinação em tubos

Também chamada de prova lenta, é utilizada em associação com o teste do mercaptoetanol para confirmar resultados positivos em provas de rotina.

Empregou-se antígeno de célula total (antígeno para soroaglutinação lenta), preparado com *Brucella abortus* amostra 1.119/3, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), na concentração final de 0,045% de volume celular.

Como diluente foi utilizada solução salina 0,85%, com uma concentração final de 5% de fenol.

Os soros foram testados em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com volume final de 2mL da mistura diluente-soro-antígeno.

A leitura foi realizada após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação.

A interpretação dos resultados foi realizada em paralelo com aqueles da prova do mercaptoetanol, segundo o Quadro 4, considerando-se o grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições, classificando-se como: completo (+), incompleto (I) ou negativo (-), de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

Quadro 4. Interpretação do teste do 2-mercaptoetanol para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade.

SAL (UI/mL)	2-ME (UI/mL)	Interpretação
≤50	<25	Negativo
≥100	<25	Inconclusivo
≥25	≥25	Positivo

SAL: teste de soroaglutinação lenta
 2-ME: prova do 2 mercaptoetanol
 UI: Unidade internacional

4.5 – Cultivo e isolamento de *Leptospira* spp.

Para cultivo e isolamento de leptospira foram utilizados rins, fígado e conteúdo estomacal de fetos e placentas de vacas abatidas em frigorífico, e líquido folicular dos ovários dessas fêmeas. O cultivo de leptospira foi realizado pela semeadura de 0,5 mL de cada material em 5 mL de meio semi-sólido de Fletcher² (Anexo) acrescido de 5-fluorouracil³, na proporção de 400µL/mL de meio, nas primeiras 24 horas de cultivo, seguido de repicagem e cultivo em meio livre de antibiótico. Após a semeadura, os tubos foram incubados à temperatura de 28° C durante 12 semanas, observando-se a ocorrência de anel de opalescência e realizando-se leituras semanais em microscopia de campo escuro, com objetiva de 40x e ocular de 15x. Cultivos com formação do anel de opalescência foram submetidos à PCRM.

4.6 – Cultivo e isolamento de *Brucella* spp.

Para cultivo e isolamento de *Brucella* spp. foram utilizados conteúdo estomacal e fragmentos de pulmão e baço de fetos e placentas de vacas abatidas em frigorífico, e líquido folicular dos ovários dessas fêmeas. O meio de cultivo utilizado foi o Bacto Brucella Agar⁴ acrescido de 5% de soro de coelho e 20 µg/mL de vancomicina e 10 µg/mL de ácido nalidíxico. O cultivo foi realizado à temperatura de 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, observando-se o crescimento diariamente até o dia 10 após o início da incubação. Cultivos suspeitos de isolamento foram submetidos à PCRM.

² Difco laboratories

³ Hoffman – Roche

⁴ Difco laboratories 0964-17-5

4.7 – Reação em cadeia da polimerase multiplex

A técnica de PCRM foi realizada no laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução no Instituto Biológico de São Paulo.

4.7.1 - Preparo das amostras para a PCR

Aproximadamente dois gramas de cada amostra clínica (rim, fígado, baço, pulmão, e placenta) foram macerados conjuntamente no homogeneizador (Stomacher 80), de forma a obter-se um “pool”, e este foi ressuspendido em tampão TE (10% p/v) (Anexo) e armazenado à temperatura de -20 °C até o momento da extração do DNA. As amostras de conteúdo estomacal, líquido folicular, oócitos em PBS e meio de cultivo com crescimento bacteriano foram armazenadas à temperatura de -20 °C até o momento da extração do DNA

4.7.2 - Protocolo de extração do DNA

4.7.2.1 - Extração de DNA por DNAzol

As amostras de rim, fígado, baço, pulmão, placenta e conteúdo estomacal foram submetidas a extração de DNA com o reagente comercial DNAzol (Invitrogen®), adaptado de CHOMCZYNSKI (1993), como descrito no protocolo abaixo:

- Centrifugar um mililitro de cada amostra a 2.000 x g por 10 minutos para precipitar debris celulares
- Adicionar 100 µL da amostra a 1 mL do reagente DNAzol (Gibco BRL)
- Homogeneizar por inversão
- Centrifugar a 10.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente
- Descartar o sobrenadante e ao “pellet” adicionar 500 µL de etanol absoluto
- Deixar à temperatura ambiente por um a três minutos para precipitar o DNA do lisado
- Centrifugar a 4.000 x g por dois minutos e descartar o sobrenadante

- Proceder a duas lavagens do “pellet” de DNA com 850 μ L de etanol absoluto, aguardando-se 1 minuto para sua precipitação
- Centrifugar a 4.000 x g por dois minutos
- Retirar todo o etanol com a pipeta e aguardar aproximadamente 20 segundos
- Dissolver o DNA em 100 μ L de NaOH (8 mM) bem vagarosamente, passando o “pellet” através da ponteira de uma pipeta
- Adicionar 40 μ L de solução Hepes 0,1 M para ajustar a solução de DNA para pH neutro
- Estocar à temperatura de -20°C , ou utilizar imediatamente para amplificação.

4.7.2.2 - Extração de DNA por fervura: fenol

As amostras de líquido folicular, oócitos em PBS e meio de cultivo com crescimento bacteriano foram submetidas a extração de DNA por fervura com fenol, adaptado de RICHTZENHAIN et al. (2002), como descrito no protocolo abaixo:

- Adicionar 200 μ L da amostra a 400 μ L de TE
- Agitar os tubos e centrifugar a 13.000 x g por 30 minutos
- Desprezar o sobrenadante dos tubos
- Ressuspender o sedimento em 300 μ L de TE
- Ferver em banho-maria seco à temperatura de 99°C por 15 minutos
- Adicionar 150 μ L de fenol tamponado
- Agitar e centrifugar a 13.000 x g por cinco minutos
- Transferir 300 μ L da fase aquosa para novo microtubo
- Adicionar 100 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)
- Agitar e centrifugar a 13.000 x g por cinco minutos
- Transferir 200 μ L da fase aquosa para novo microtubo
- Adicionar 40 μ L de acetato de sódio 2 M (1/5 do volume)
- Adicionar 480 μ L de etanol puro (duas vezes volume total)
- Homogeneizar por inversão

- Manter a temperatura de -20°C por pelo menos 3 horas
- Centrifugar a 13.000 x g por 15 minutos
- Descartar o sobrenadante por inversão
- Adicionar 500 µL de etanol 70%
- Homogeneizar por inversão
- Centrifugar a 13.000 x g por 15 minutos
- Descartar o sobrenadante por inversão
- Secar na estufa a 45°C por 15 minutos
- Adicionar 40 µL de TE
- Incubar em banho-maria a 56°C por 15 minutos (mix 350rpm)
- Estocar à temperatura de -20°C, ou utilizar imediatamente para amplificação.

4.7.3 – Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)

Para amplificação de DNA de *Leptospira* spp. foram escolhidos os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos Lep 1 e Lep 2 (331pb), descritos por MÉRIEM et al. (1993), e para *Brucella* spp., os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos B4 e B5 (223 pb), descritos por BAILY et al. (1992).

“PRIMERS”	SEQÜÊNCIA
Lep 1	5' GGC GGC GCG TCT TAA AÇA TG 3'
Lep 2	3' TTA GAA CGA GTT ACC CCC CTT 5'
B4	5' TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3'
B5	3' CGC GCT TGC CTT TCA AGG TCT G 5'

4.7.4 – Amplificação do DNA bacteriano

A amplificação das amostras de DNA foi realizada em microtubos de 500µL, com volume final de 50µL, de acordo com o protocolo de RICHTZENHAIN et al. (2002), descrito a seguir, uma vez que por essa técnica podem-se detectar ao mesmo tempo dois dos

mais importantes microrganismos da esfera reprodutiva, *Leptospira* spp. e *Brucella* spp.:

- Adicionar 15 µL de água ultrapura (Milli Q)
- Adicionar 5,0 µL de tampão 50 mM 10 X (500 mM de KCl)
- Adicionar 1,5 µL MgCl₂. 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0
- Adicionar 8,0 µL da mistura de dNTPs (200µM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP])
- Adicionar 2,5 µL de Lep 1 (10 pmol/µL)
- Adicionar 2,5 µL de Lep 2 (10 pmol/µL)
- Adicionar 2,5 µL de B4 (10 pmol/µL)
- Adicionar 2,5 µL de B5 (10 pmol/µL)
- Adicionar 0,5 µL de *Taq* DNA-polimerase (cinco unidades por µL)
- Adicionar 10 µL da amostra de DNA extraído

O ciclo empregado foi aquele preconizado por RICHTZENHAIN et al. (2002). Inicialmente foi realizada a desnaturação da fita, utilizando a temperatura de 94°C por 3 minutos. Foram empregados 35 ciclos, divididos em quatro fases, como descrito abaixo:

- Desnaturação do DNA: 94°C/60seg
- Anelamento dos “primers”: 60°C/60seg
- Polimerização do DNA: 72°C/90seg
- Extensão final: 72°C/10min

4.7.5 – Análise do produto amplificado

A análise do produto amplificado (331 pb para o 16S RNAr do gene de *Leptospira* spp. e 223 pb para o gene de *Brucella* spp.) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), utilizando-se tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045M tris-borato e 1mM de EDTA, pH 8,0), segundo SAMBROOK et al. (1989), como segue.

Em cada uma das cavidades do gel foram colocados 10µL de uma mistura contendo 8µL de produto amplificado e 2µL de corante (azul de bromofenol 0,25%,

glicerol 30%). O gel foi submetido a uma voltagem constante de 6-7V por centímetro de distância entre os eletrodos em cuba horizontal, contendo tampão de corrida TBE 0,5%.

A revelação das bandas foi realizada por meio da imersão do gel em uma solução de brometo de etídio a 0,5µg por mL durante 20 minutos, e posterior observação em transluminador ultravioleta (300-320 nm). O gel foi fotografado pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

Como controle da extração foram contaminadas experimentalmente amostras de órgãos com 100 µL de cultura pura de *Leptospira* sorovar Hardjo estirpe Hardjoprajitino a 10^8 e com 10µL de cultura escala 8 Mc Farland ($2,3 \times 10^9$ bact/mL) de *Brucella abortus* ATCC 544.

Como controle positivo para a leptospirose foi utilizado o sorovar Hardjo estirpe Hardjoprajitino

Como controle positivo da reação para brucelose foi empregada uma suspensão bacteriana ($2,8 \times 10^9$ UFC/ml) em cultura da estirpe padrão de *Brucella abortus* 1119/3, que é utilizada na produção de antígeno de brucelose realizada no Instituto Biológico.

Como controle negativo da PCR foi utilizada a mistura da reação da PCR sem DNA, contendo 10µL de água ultrapura.

4.8 – Obtenção dos oócitos

Os ovários foram transportados do abatedouro até o laboratório em caixas térmicas, procurando-se não exceder ao período de 6 horas entre o abate e o início das aspirações. Após os resultados da sorologia, os ovários foram separados em três grupos de acordo com a condição dos animais: vacas apenas com leptospirose, vacas com brucelose acompanhada ou não de leptospirose e vacas negativas para as duas enfermidades. (Fluxogramas 1 e 2).

As punções dos folículos ovarianos ocorreram manualmente, empregando-se seringa de 10 mL e agulha calibre 18G1½ (1,20x40mm), ambas descartáveis. Todo líquido aspirado foi transferido para tubos de poliestireno estéreis de 50 mL com tampa

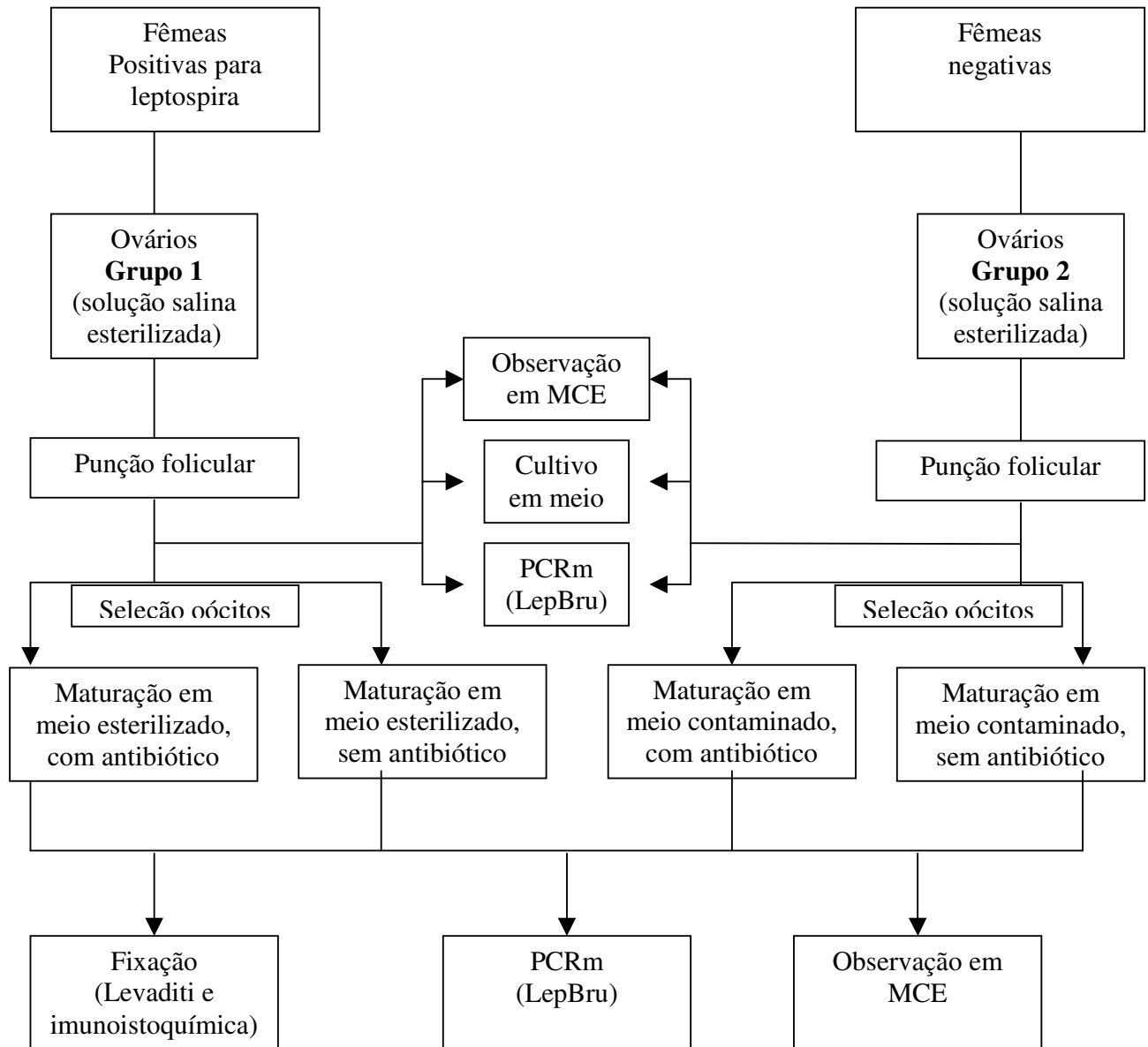
rosqueável, separados de acordo com os grupos acima mencionados, e esse material foi homogeneizado e deixado em descanso por 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi examinado em placas de poliestireno de 60mm de diâmetro.

Alíquotas do líquido folicular de cada grupo foram incubadas em meios de cultivo próprios para *Leptospira* spp. e *Brucella* spp., e outras alíquotas foram mantidas à temperatura de -20°C para posterior avaliação da presença de material genético pela prova de PCRm.

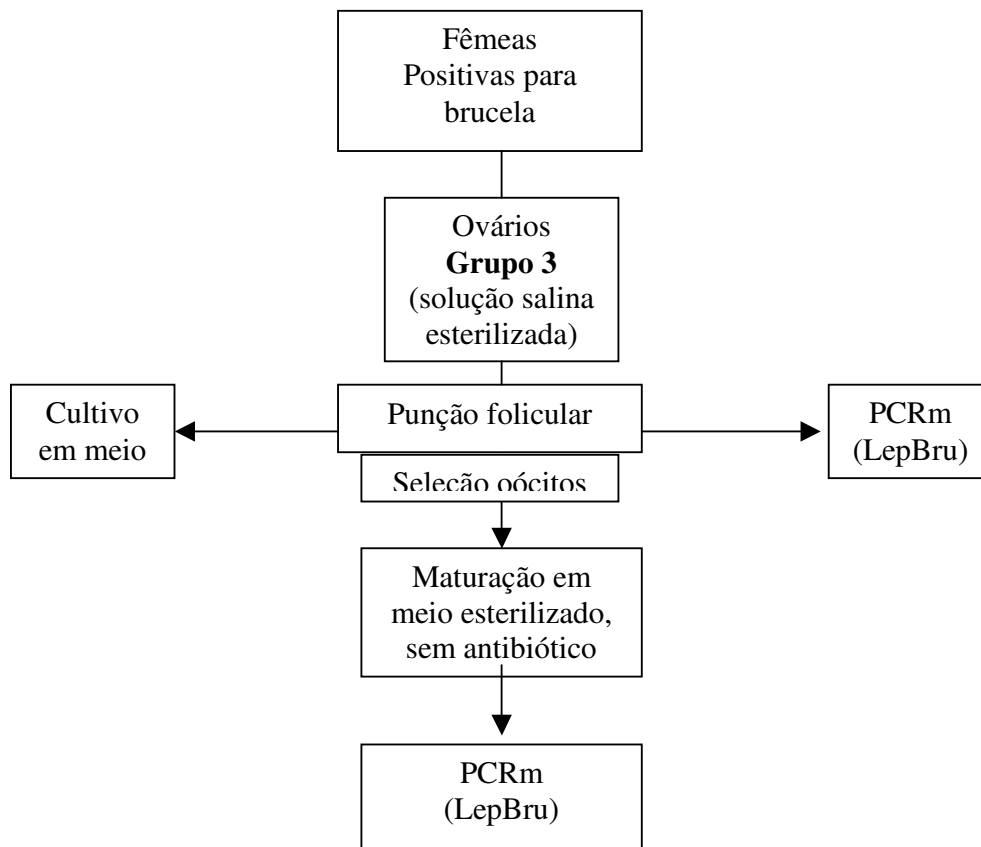
Em seguida os oócitos que se apresentavam total ou parcialmente revestidos pelas células do “cumulus oopharus” foram selecionados e agrupados em meios de maturação de acordo com o propósito do trabalho (Fluxogramas 1 e 2):

1. Oócitos oriundos dos ovários de fêmeas positivas para leptospirose foram observados em microscopia de campo escuro e maturados em meio estéril, com e sem antibiótico, por 24 horas em estufa de CO_2 a 5% e à temperatura de $38,5^{\circ}\text{C}$, sendo então submetidos à PCRm e novamente à visualização em microscopia de campo escuro e às técnicas de Levaditi e imunoistoquímica para detecção e identificação da localização das leptospiros nos oócitos.
2. Oócitos dos ovários provenientes de fêmeas negativas, para leptospirose e brucelose, foram submetidos ao mesmo procedimento do grupo acima, porém maturados em meio contaminado com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona (estirpe LPF).
3. Oócitos provenientes de vacas sorologicamente positivas para *Brucella* spp. foram maturados em meio esterilizado sem antibióticos adicionais.

Fluxograma 1. Protocolo de investigação da presença de leptospiros em oócitos bovinos oriundos de fêmeas reagentes e não reagentes na prova de soroaglutinação microscópica, e maturados, respectivamente, em meio estéril e em meio experimentalmente contaminado com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. Jaboticabal, 2006.



Fluxograma 2. Protocolo de investigação da presença de brucela em oócitos bovinos oriundos de fêmeas reagentes na prova do antígeno acidificado tamponado, e maturados em meio de maturação sem antibióticos adicionais. Jaboticabal, 2006.



4.9 – Seleção e maturação dos oócitos

Os oócitos, observados em lupa, que se apresentavam total ou parcialmente revestidos com complexo "cumulus oopharus" compacto foram passados quatro vezes em meio de lavagem (TCM 199 A⁵ suplementado com 10% de Soro fetal Bovino ⁶ (SFB), 0,2 mM de piruvato de sódio⁷ e 75µg de gentamicina⁶/mL), para então serem transferidos para

⁵ Gibico cod. 12340-030

⁶ Gibico cod. 10270-106

⁷ Sigma

microgotas de meio TCM 199 B ⁸ suplementado com 10% SFB, 0,2mM de piruvato de sódio⁶, 75µg de gentamicina/mL, 0,5µg de FSH⁹/mL, 50µg de LH¹⁰/mL e 1µg de 17β estradiol⁶/mL, e mantidos durante 24 horas na atmosfera de 5% de CO₂ em ar, umidade relativa de 100% e à temperatura de 38,5°C. Aos grupos com antibiótico foram adicionadas estreptomicina⁶ (50µL/mL) e penicilina⁶ (70µL/mL)⁹.

4.10 – Contaminação do meio de maturação

A contaminação do meio de maturação foi realizada com *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe *Leptospira* from (LPF), na concentração de 5,0 x 10⁶ leptospiros por mililitro (RODRIGUES et al., 2003)

4.11 – Preparação dos oócitos para as técnicas de coloração

Os oócitos foram removidos do meio de maturação e transferidos para gotas de 100µL de pronase 0,5% (Anexo) por duas vezes (meio de desnudação para retirada das células do “cumulus oophorus”), sendo em seguida lavados em gotas de 100µL de meio de lavagem*, por cinco vezes. Os oócitos destinados à PCRm foram lavados mais duas vezes em PBS e depositados em microtubos de 0,5 mL com PBS. Tratamento semelhante ao recebido pelos oócitos desnudos destinados à PCRm foi dado às células do “cumulus oophorus” que se desprenderam durante a passagem nas gotas de pronase 0,5% .

Os oócitos que se destinavam à coloração não passaram pelo PBS puro e foram fixados em gotas de 100µL de uma solução de paraformaldeído (4% em PBS, pH 7,4), e passados para gotas de lavagem de PBS/PVP (polivinilpirolidona)(1mg/ml), sendo a

⁸ Gibco cód. 11150-059 (já acrescido de bicarbonato de sódio – NaHCO₃)

⁹ Foltropin

¹⁰ Loutropin

⁹ Manual de procedimentos para produção *in vitro* de embriões bovinos - Departamento de Reprodução Animal, FCAV - Unesp, Campus de Jaboticabal.

* idem item 4.9

seguir transferidos para lâminas previamente revestidas em uma solução 1/10 de pili-I-lisina¹¹ e deixados à temperatura ambiente por 24 horas para secagem (LOPES et al., 2002). Em seguida, as lâminas, com os oócitos, foram submergidas em álcool 95% para melhor fixação do material e secadas em estufa, após esse processo os oócitos foram submetidos às técnicas da reação de imunoistoquímica* e Levaditi (Mc MANUS & MOWRY, 1965) para pesquisa de antígenos do sorovar Pomona.

Algumas lâminas foram preparadas com os oócitos desnudos e outras foram preparadas apenas com as células do complexo “cumulus oophorus”, assim foram formados dez grupos para a pesquisa da presença de *Leptospira* spp. e/ou *Brucella* spp. nos oócitos, conforme apresentado no quadro 5:

Quadro 5. Grupos formados para pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em oócitos após a maturação e desnudação.

Grupo	Condição do oócito	Procedência	Maturação
G1	Desnudo	Vacas reagentes para L.	Meio estéril, com ATB adicionais
G2	Desnudo	Vacas reagentes para L.	Meio estéril, sem ATB adicionais
G3	Desnudo	Vacas reagentes para B	Meio estéril, sem ATB adicionais
G4	Desnudo	Vacas negativas para L. e B.	Meio contaminado*, com ATB adicionais
G5	Desnudo	Vacas negativas para L. e B.	Meio contaminado*, sem ATB adicionais
G6	CO	Vacas reagentes para L.	Meio estéril, com ATB adicionais
G7	CO	Vacas reagentes para L.	Meio estéril, sem ATB adicionais
G8	CO	Vacas reagentes para B.	Meio estéril, sem ATB adicionais
G9	CO	Vacas negativas para L. e B.	Meio contaminado*, com ATB adicionais
G10	CO	Vacas negativas para L.e B.	Meio contaminado*, sem ATB adicionais

CO: “cumulus oophorus” L: leptospirose B: brucelose ATB: antibióticos

* com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona

¹¹ Sigma cod. P8920

* Curso Ervigas

4. 12 – Reação de Imunoistoquímica

Para a reação de imunoistoquímica, após a fixação do oócito na lâmina, foram seguidos os seguintes passos:

- Bloqueio da peroxidase endógena por uma solução composta por 95 mL de metanol e 5 mL de água oxigenada durante 15 minutos em temperatura ambiente, protegido de luz;
- Três lavagens em tampão fosfato-salina (PBS) 0,01 M pH 7,4 por cinco minutos;
- Incubação com antissoro específico de coelho antileptospira com título de 1/12.800, por 12 horas a 4°C (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos – FMVZ – USP, São Paulo);
- Três lavagens em tampão fosfato-salina (PBS) 0,01 M pH 7,4 por cinco minutos;
- Incubação com anticorpo secundário (IgG de coelho antiimunoglobulinas de coelho), por 45 minutos à temperatura ambiente;
- Três lavagens em tampão fosfato-salina (PBS) 0,01 M pH 7,4, por cinco minutos;
- Incubação com complexo avidina-biotina (Kit Easypath – Super ABC) por 45 minutos à temperatura ambiente;
- Três lavagens em tampão fosfato-salina (PBS) 0,01 M pH 7,4 por cinco minutos, em dois banhos à temperatura ambiente;
- Revelação com solução-substrato recém-preparada, contendo tetra-hidrocloro de diaminobenzidina (DAB), durante 5 a 8 minutos em recipiente de paredes escuras e em sala escura (DAB reagent set KPL – Cód. 54-10-00);
- Lavagem em água destilada por cinco minutos;
- Contracoloração com hematoxilina de Harris, por um minuto e lavagem em água corrente;
- Desidratação em série de álcoois em concentrações crescentes (50%, 80%, 95% I e II, absoluto I, II e III) e em xilol I, II e III;
- Montagem em bálsamo do Canadá (Synth).

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz óptica (Carl Zeiss) com ocular 10X e objetivas 40X e 100X (imersão), com condensador de campo claro.

4.13 – Técnica de Levaditi

Após a fixação do oócito na lâmina seguiu-se a técnica de Levaditi. Essa técnica foi executada conforme o procedimento descrito por MC MANUS & MOWRY (1965):

- Lavagem em álcool 96° por 24 horas;
- Lavagem em álcool - 70° por 24 horas;
- Retirada do álcool e imersão em água;
- Revelação em solução de nitrato de prata¹², por 72 horas à temperatura de 37 °C, no escuro (Anexo);
- Bloqueio da reação em solução redutora, por 24 a 72 horas à temperatura de 37°C, no escuro (Anexo);
- Lavagem em água destilada;
- Desidratação em série de álcoois em concentrações crescentes (70%, 95%, absolutos I, II e III) e em xilol.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz óptica (Carl Zeiss) com ocular 10X e objetivas 40X e 100X (imersão), com condensador de campo claro.

4.14 – Análise estatística

A frequência de alterações observadas em fetos de fêmeas reagentes a leptospira foi comparada com a frequência observada em fetos de vacas não reagentes, por meio de teste de qui-quadrado (BERQUÓ et al., 1980).

¹² Nuclear 2850

5 – RESULTADOS

Das 512 vacas analisadas (entre gestantes e não gestantes) foram observadas 234 (45,70%) vacas sororreagentes para leptospirose na prova de SAM a pelo menos um dos 24 sorovares de *Leptospira* spp. utilizados, sendo o sorovar Hardjo (67,09%) o predominante; e os títulos variaram de 50 (24,2%) a 1.600 (1,9%) (Tabela 1).

Tabela 1. Título de aglutininas de 234 vacas sororreagentes para leptospirose pela prova de soroaglutinação microscópica, para um ou mais dos sorovares Wolffi, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Tarassovi e Autumnalis, entre 512 vacas, abatidas em frigorífico, avaliadas no período de março de 2005 a novembro de 2006, Jaboticabal, 2006.

SOROVAR	TÍTULOS												TOTAL		
	50		100		200		400		800		1.600				
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	% ^a	% ^b
Hardjo	28	6,10	49	10,67	41	8,93	19	4,14	13	2,83	07	1,52	157	30,66	67,09
Wolffi	27	5,88	48	10,46	25	5,45	22	4,79	14	3,05	02	0,43	138	26,95	59,00
Icterohaemorrhagiae	34	7,41	27	5,88	09	1,96	03	0,65	00	00	00	00	73	14,26	31,20
Tarassovi	10	2,18	17	3,70	12	2,61	09	1,96	05	1,09	00	00	53	10,35	22,65
Grippotyphosa	05	1,09	09	1,96	06	1,31	01	0,22	00	00	00	00	21	4,10	8,97
Canicola	04	0,87	04	0,87	02	0,43	00	00	00	00	00	00	10	1,95	4,27
Pomona	02	0,43	01	0,22	00	00	03	0,65	00	00	00	00	06	1,17	2,56
Autumnalis	01	0,22	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	01	0,19	0,43
TOTAL	111	24,2	155	33,8	95	20,7	57	12,4	32	6,9	09	1,9	459	89,63	196,17

a: em relação ao total de animais examinados (512)

b: em relação ao total de animais sororreagentes (234)

Considerando-se apenas o sorovar de maior título para cada vaca sororreagente na SAM, o sorovar Hardjo permaneceu como o predominante, seguido dos sorovares Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Grippytyphosa, Canicola e Pomona, e os títulos variaram de 50 a 1.600 (Tabela 2). Com essa comparação, procurou-se evitar os casos de coaglutinação.

Tabela 2. Prevalência dos sorovares Hardjo, Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Grippytyphosa, Canicola e Pomona, analisando-se apenas o sorovar de maior título de aglutininas e desconsiderando os animais que obtiveram títulos iguais para dois ou mais sorovares, entre 512 vacas, abatidas em frigorífico, avaliadas no período de março de 2005 a novembro de 2006, Jaboticabal, 2006.

SOROVAR	TÍTULOS												TOTAL		
	50		100		200		400		800		1.600		Nº	% ^a	% ^b
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%			
Hardjo	07	3,76	14	7,52	27	14,5	08	4,30	10	5,37	07	3,76	73	14,2	39,2
Wolffi	02	1,07	10	5,37	09	4,84	15	8,06	08	4,30	02	1,07	46	8,98	24,7
Icterohaemorrhagiae	05	2,69	13	7,00	03	1,61	03	1,61	00	00	00	00	24	4,69	12,9
Tarassovi	00	00	07	3,76	07	3,76	06	3,22	03	1,61	00	00	23	4,49	12,4
Grippytyphosa	02	1,07	04	2,15	02	1,07	00	00	00	00	00	00	08	1,56	4,30
Canicola	02	1,07	02	1,07	03	1,61	00	00	00	00	00	00	07	1,36	3,76
Pomona	02	1,07	00	00	00	00	03	00	00	00	00	00	05	0,98	2,69
TOTAL	20	10,7	50	26,9	51	27,4	35	18,8	21	11,3	09	4,84	186	36,33	100

a: em relação ao total de animais examinados (512)

b: em relação ao total de animais sororreagentes (186)

Entre as 212 amostras de soro sangüíneo das vacas prenhas avaliadas no período de março a junho de 2005, 95 (44,81%) foram reagentes a pelo menos um dos 24 sorovares de *Leptospira* spp. utilizados na SAM, com títulos que variaram de 50 (24,58%) a 1.600 (0,58%), sendo o sorovar Hardjo (84,21% das 95 vacas reagentes) o mais freqüentemente observado (Tabela 3).

Tabela 3. Título de aglutininas de 95 vacas sororreagentes para leptospirose pela prova de soroaglutinação microscópica, para um ou mais dos sorovares Wolffi, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Grippotyphosa, entre 212 vacas prenhas, abatidas em frigorífico, avaliadas no período de março a junho de 2005, Jaboticabal, 2006.

SOROVAR	TÍTULOS												TOTAL		
	50		100		200		400		800		1.600		Nº	% ^a	% ^b
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%			
Hardjo	17	9,5	25	13,9	22	12,3	10	5,6	05	2,8	01	0,6	80	37,73	84,21
Wolffi	13	7,3	15	8,4	09	5,0	10	5,6	04	2,2	00	0,0	51	24,06	53,68
Icterohaemorrhagiae	12	6,7	19	10,6	07	3,9	03	1,7	00	0,0	00	0,0	41	19,34	43,16
Pomona	00	0,0	01	0,6	00	0,0	03	1,7	00	0,0	00	0,0	04	1,89	4,21
Grippotyphosa	02	1,1	00	0,0	01	0,6	00	0,0	00	0,0	00	0,0	03	1,41	3,16
TOTAL	44	24,6	60	33,5	39	21,8	26	14,5	09	5,0	01	0,6	179	84,43	188,42

a: em relação ao total de animais examinados (212)

b: em relação ao total de animais sororreagentes (95)

Cinqüenta (9,76%) vacas das 512 avaliadas foram sororreagentes à *Brucella* spp. na prova AAT, sendo 34 (6,64%) confirmadas pela prova do mercaptoetanol.

Das 212 vacas prenhas, vinte e duas (10,38%) foram reagentes à *Brucella* spp. na prova AAT, sendo 14 (6,60%) confirmadas pela prova do mercaptoetanol (Tabela 4).

Tabela 4. Título de aglutininas da prova do mercaptoetanol em 22 vacas sororreagentes no teste do antígeno acidificado tamponado, entre 212 vacas prenhas, abatidas em frigorífico, avaliadas no período de março a junho de 2005, Jaboticabal, 2006.

DATA*	Número	Prova confirmatória		Interpretação
		2-ME	SAL	
15 / 03 / 05	01	25	25	P
06 / 04 / 05	02	400	400	P
06 / 04 / 05	03	200	400	P
06 / 04 / 05	04	N	N	N
12 / 04 / 05	05	200	400	P
12 / 04 / 05	06	50	50	P
12 / 04 / 05	07	50	100	P
12 / 04 / 05	08	200	400	P
12 / 04 / 05	09	200	400	P
13 / 04 / 05	10	200	400	P
13 / 04 / 05	11	N	N	N
05 / 05 / 05	12	25	50	P
05 / 05 / 05	13	N	N	N
10 / 05 / 05	14	N	25	N
10 / 05 / 05	15	100	200	P
10 / 05 / 05	16	N	25	N
12 / 05 / 05	17	N	N	N
12 / 05 / 05	18	N	N	N
12 / 05 / 05	19	50	50	P
12 / 05 / 05	20	N	25	N
08 / 06 / 05	21	50	50	P
08 / 06 / 05	22	25	50	P
TOTAL	22	-	-	14
%^a	10,38			6,60

*: data da colheita no frigorífico

P: positivo N: negativo

^a em relação ao total de animais examinados (212)

Nenhum dos 213 fetos avaliados no período de março a junho de 2005 (com idade gestacional de quatro a sete meses) apresentou reação nas provas sorológicas para *Leptospira* spp. ou *Brucella* spp., porém os resultados dos cultivos de leptospira em meio Fletcher e os resultados da avaliação macroscópica de alterações patológicas nos órgãos dos fetos (rim, fígado, pulmão e baço: icterícia, hemorragia e/ou friável; conteúdo estomacal: coloração amarelo-ouro e/ou pastoso), apresentados na Tabela 5, sugerem que fetos de mães reagentes já estavam afetados por esses agentes, embora não apresentassem anticorpos.

Tabela 5. Resultados dos cultivos de rim, fígado, baço, pulmão, conteúdo estomacal dos fetos e dos cotilédones das fêmeas abatidas e as alterações patológicas encontradas nesses órgãos.

ORGÃO	CULTIVO ^a <i>Leptospira</i>	CULTIVO ^b <i>Brucella</i>	ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS	
			Nº fetos	TIPO
RIM	02	-	3	A,B
FÍGADO	01	-	30	A,B,G
BAÇO	-	0	5	B
PULMÃO	-	0	4	B
CONTEÚDO ESTOMACAL	0	0	70	H,I
PLACENTA	0	0	33	B,C,D,E,F
TOTAL de órgãos afetados	03	0	145	-
TOTAL de animais afetados	03	0	88	-

a. cultivo em meio Fletcher

b. cultivo em meio Brucela-agar

-: não avaliado

A: icterícia, B: hemorragia, C: palidez, D: disformidade, E: formações fibrosas, F: granulomatose, G: friável, H: coloração amarelo-ouro, I: pastoso

O número de fetos (88), oriundos de fêmeas soropositivas para leptospirose, com alguma alteração patológica foi superior ao daqueles oriundos de mães soronegativas (19) ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre fetos com alterações patológicas em rim, oriundos de vacas positivas e de vacas negativas ($p > 0,05$). Em relação à frequência de observações de patologias nos pulmões e baços entre fetos oriundos de mães positivas e negativas, houve diferenças significativas, com 95% de significância ($p < 0,05$). As diferenças foram significativas ($p < 0,01$) para a comparação de alterações nos fígados e conteúdos estomacais entre fetos de vacas positivas e negativas e nas placentas entre as mesmas fêmeas (Tabela 6). Devido a pequena amostragem de fetos oriundos de vacas soropositivas apenas para brucelose, não foi possível fazer a mesma comparação de alterações patológicas entre fetos oriundos de fêmeas soropositivas e soronegativas para *Brucella* spp..

Tabela 6. Qui-quadrado (χ^2) e significância estatística (P) observados conforme as alterações morfológicas nos órgãos de fetos provenientes de vacas soropositivas e soronegativas e da placenta dessas fêmeas, na reação de soroaglutinação microscópica para *Leptospira* spp..

ORGÃO	χ^2	P	Alterações Patológicas Vacas Soropositivas (95)		Alterações Patológicas Vacas Soronegativas (117)	
			Nº	TIPO	Nº	TIPO
Rim	003,77	$>0,05$	03	A,B	00	-
Fígado	028,38	$<0,01$	30	A,B,G	05	B,G
Baço	006,31	$<0,05$	05	B	00	B
Pulmão	005,03	$<0,05$	04	B	00	B
Conteúdo Estomacal	107,13	$<0,01$	70	H,I	06	H,I
Placenta	013,08	$<0,01$	33	B,C,D,E,F	16	B,D
Total de órgãos afetados	-	-	145	-	27	-
Total de animais afetados	122,39	$<0,01$	88	-	19	-

-: não avaliado

A: icterícia, B: hemorragia, C: palidez, D: disformidade, E: formações fibrosas, F: granulomatose, G: friável, H: coloração amarelo-ouro, I: pastoso

Dos 95 fetos de vacas reagentes na SAM, 43 apresentaram resultados com crescimento sugestivo de isolamento de *Leptospira* spp. em meio Fletcher, e dos 14 fetos de vacas reagentes para *Brucella* spp. seis apresentaram colônias bacterianas com características similares ao de cultivo em meio Brucella-ágar. Para confirmação do isolamento optou-se pela PCRm para *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. (RICHTZENHAIN et al., 2002). Em três cultivos de *Leptospira* spp., foi possível confirmar o isolamento por meio da PCRm, sendo dois a partir de rim e um de fígado de diferentes fetos; nenhum cultivo de *Brucella* spp. foi confirmado (Figura 1). Pela mesma técnica de PCRm não foi verificada a presença de DNA de *Leptospira* spp. ou *Brucella* spp. em nenhum dos órgãos dos fetos avaliados.

As placentas das fêmeas foram negativas na PCRm, e os dois cultivos em meio Fletcher, com formação de anel de opalescência, sugestivo de isolamento de leptospira, não foram confirmados.

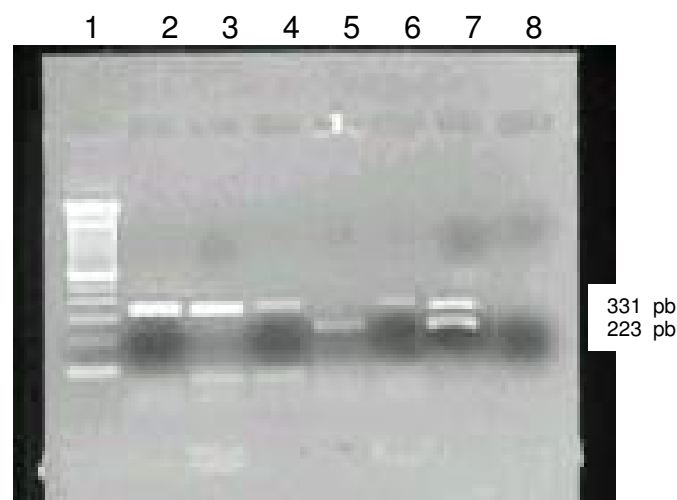


Figura 1- Resultados por eletroforese da amplificação por Multiplex - PCR para detecção simultânea de *Leptospira* spp e *Brucella* spp: 1- Marcador de peso molecular (100 pb), 2- meio de cultivo Fletcher (cultivo de rim), 3- meio de cultivo Fletcher (cultivo de rim), 4- meio de cultivo Fletcher (cultivo de fígado), 5- órgão contaminado experimentalmente com *Brucella abortus* (ATCC 544), 6- órgão contaminado experimentalmente com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo estirpe Hardjoprajitino, 7- Controle positivo: *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo + *Brucella abortus* (ATCC 544), 8- Controle negativo.

Para a pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nos oócitos de vacas, foram realizadas 10 colheitas de agosto de 2005 a novembro de 2006 com um total de 300 vacas, das quais 139 (46,33%) foram reagentes na SAM a pelo menos um dos 24 sorovares utilizados, com títulos que variaram de 50 (23,9%) a 1.600 (2,8%), e o sorovar predominante foi o Wolffi (62,59% das 139 vacas sororeagentes)(Tabela 7), e 29 (9,67%) foram reagentes na prova do AAT, sendo 21 (7%) confirmadas na prova do mercaptoetanol, conforme Tabela 8.

Tabela 7. Título de aglutininas de 139 vacas sororreagentes para leptospirose pela prova de soroaglutinação microscópica, para um ou mais dos sorovares Wolffi, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Tarassovi e Autumnalis, entre 300 vacas, abatidas em frigorífico, avaliadas no período de agosto de 2005 a novembro de 2006, Jaboticabal, 2006.

SOROVAR	TÍTULOS												TOTAL		
	50		100		200		400		800		1.600		Nº	% ^a	% ^b
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%			
Wolffi	14	5,00	33	11,78	16	5,71	12	4,28	10	3,57	02	0,71	87	29,00	62,59
Hardjo	11	3,93	24	8,57	19	6,78	09	3,21	08	2,86	06	2,14	77	25,67	55,39
Tarassovi	10	3,57	17	6,07	12	4,28	09	3,21	05	1,78	00	00	53	17,67	38,13
Icterohaemorrhagiae	22	7,86	08	2,86	02	0,71	00	00	00	00	00	00	32	10,67	23,02
Grippotyphosa	03	1,07	09	3,21	05	1,78	01	0,36	00	00	00	00	18	6,00	12,95
Canicola	04	1,43	04	1,43	02	0,71	00	00	00	00	00	00	10	3,33	7,19
Pomona	02	0,71	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	02	0,67	1,44
Autumnalis	01	0,36	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	01	0,33	0,72
TOTAL	67	23,9	128	45,7	56	20,0	31	11,1	23	8,2	08	2,8	280	93,34	201,43

a: em relação ao total de animais examinados (300)

b: em relação ao total de animais sororreagentes (139)

Tabela 8. Título de aglutininas da prova do mercaptoetanol em 28 vacas sororreagentes no teste do antígeno acidificado tamponado, entre 300 vacas, abatidas em frigorífico, avaliadas no período de agosto de 2005 a novembro de 2006, Jaboticabal, 2006.

DATA*	Número	Prova confirmatória		Interpretação
		2-ME	SAL	
16 / 08 / 05	01	N	25	N
16 / 08 / 05	02	100	200	P
16 / 08 / 05	03	25	50	P
16 / 08 / 05	04	N	25	N
16 / 08 / 05	05	25	25	P
24 / 08 / 05	06	400	800	P
24 / 08 / 05	07	25	25	P
24 / 08 / 05	08	25	50	P
24 / 08 / 05	09	N	25	N
24 / 08 / 05	10	800	800	P
26 / 10 / 05	11	N	N	N
26 / 10 / 05	12	1.600i	1.600i	P
26 / 10 / 05	13	N	25	N
19 / 09 / 06	14	400i	400	P
19 / 09 / 06	15	400	400	P
19 / 09 / 06	16	50	50	P
26 / 09 / 06	17	200	200	P
26 / 09 / 06	18	800i	800i	P
26 / 09 / 06	19	50	50	P
26 / 09 / 06	20	N	100i	Inconclusivo
26 / 09 / 06	21	1.600i	1.600i	P
17 / 10 / 06	22	200	200	P
17 / 10 / 06	23	200	400i	P
24 / 10 / 06	24	N	50	N
24 / 10 / 06	25	100	200i	P
24 / 10 / 06	26	N	25	N
08 / 11 / 06	27	100	200i	P
08 / 11 / 06	28	200	200	P
08 / 11 / 06	29	25	100	P
TOTAL	29	-	-	21
%^a	9,67			7,00

*: data da colheita no frigorífico

P: positivo N: negativo

a: em relação ao total de animais examinados (300)

Foram obtidos indícios de isolamento de *Leptospira* spp. (formação de anel de opalescência) em todos os tubos com meio de cultivo Fletcher contendo “pools” de líquido folicular. Em nenhum cultivo em meio brucella-ágar houve formação de colônias bacterianas com características de crescimento de *Brucella* spp.

Em cinco cultivos em meio Fletcher foi possível detectar DNA de *Leptospira* spp. e também DNA de *Brucella* spp. (Figura 2). O DNA de *Brucella* spp. foi detectado em sete “pools” de líquido folicular (LF), e o DNA de *Leptospira* foi detectado em quatro “pools” de líquido folicular, pela técnica de PCRm (Tabela 8).

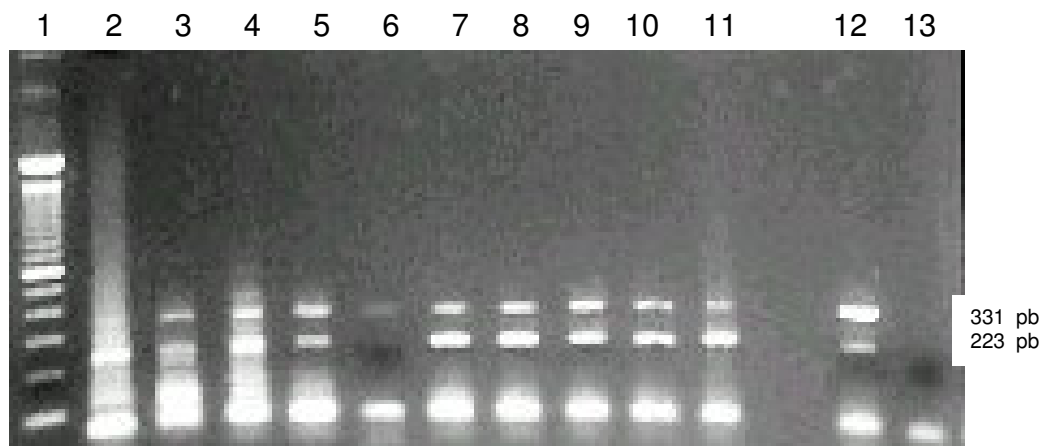


Figura 2- Resultados por eletroforese da amplificação por Multiplex - PCR para detecção simultânea de *Leptospira* spp e *Brucella* spp: 1- Marcador de peso molecular (100 pb), 2- LF (“pool” B 16/08/05), 3- LF (“pool” B+L 26/10/05), 4- LF (“pool” L 26/10/05), 5- CO (vacas L+B sem ATB 26/09/06), 6- Oócito (vacas N, meio contaminado sem ATB 08/11/06), 7- Meio Fletcher com LF (19/09/06), 8- Meio Fletcher com LF (26/09/06), 9- Meio Fletcher com LF (17/10/06), 10- Meio Fletcher com LF (24/10/06), 11- Meio Fletcher com LF (08/11/06), 12- Controle positivo: *Leptospira interrogans* sorovar Canicola + *Brucella abortus* (ATCC 544), 13- Controle negativo.

LF= líquido folicular CO=“cumulus oophorus” ATB= antibiótico

L= vacas sororreagentes para leptospirose B= vacas sororreagentes para brucelose N= negativas

Para a pesquisa da presença de *Leptospira* spp. e/ou *Brucella* spp. nos oócitos, detectou-se DNA de *Leptospira* spp. em um grupo com oócitos desnudos, provenientes de vacas soronegativas para leptospirose, maturados em meio contaminado e sem antibiótico e em um outro grupo de células do “cumulus oophorus” proveniente de vacas

sororreagentes para brucelose e leptospirose foram detectados DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. (Tabela 9) (Figura 2).

Tabela 9. Relação dos testes positivos, pela técnica de PCRM, para líquido folicular, oócitos e células do “cumulus oophorus”, oriundos de ovários colhidos de vacas no momento do abate, separadas em grupos de acordo com os resultados das sorologias para leptospirose e brucelose. Jaboticabal, 2006.

Material	Data	Vaca	Maturação	PCRM
LF	16/08/05	B+L	-	Brucella
LF	31/08/05	N	-	Brucella e Leptospira
LF	26/10/05	B+L	-	Brucella e Leptospira
LF	26/10/05	L	-	Brucella e Leptospira
LF	26/10/05	N	-	Brucella
LF	10/11/05	N	-	Brucella
LF	24/10/06	L	-	Brucella e Leptospira
CO	29/09/06	B+L	Meio estéril, sem ATB	Brucella e Leptospira
Oócito	08/11/06	N	Meio contaminado*, sem ATB	Leptospira

LF: líquido folicular CO: “cumulus oophorus” ATB: antibiótico -: não maturado

*: com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona

B: grupo de vacas sororreagentes para brucelose

L: grupo de vacas sororreagentes para leptospirose

N: grupo de vacas negativas

Pelas técnicas de Levaditi e imunoistoquímica não foram observadas leptospiros em nenhum dos grupos de oócitos desnudos ou de células do “cumulus oophorus”.

Observou-se que, embora não existissem leptospiros aderidas aos oócitos na visualização em microscopia de campo escuro, e nas técnicas de coloração, a mobilidade das leptospiros cai em torno de 50% com a utilização de gentamicina e em torno de 80 a 90% com a utilização de penicilina e de estreptomicina.

6 – DISCUSSÃO

A maior parte das pesquisas com fetos relacionadas a leptospirose e brucelose refere-se àqueles que foram abortados naturalmente, ou seja, nos casos em que a infecção na mãe não permitiu a continuação da prenhez. Este estudo é inovador no sentido de ter avaliado fetos que poderiam chegar a termo, em vacas com títulos até 1.600 para *Leptospira* spp. e na prova do mercaptoetanol para *Brucella* spp., em diferentes estágios da gestação, fetos de quatro a sete meses de desenvolvimento intra-uterino.

Das 512 vacas avaliadas, 234 (45,70%) apresentaram reação sorológica a um ou mais dos 24 sorovares de leptospira utilizados. O sorovar predominante foi o Hardjo, presente em 157 animais, ocorrendo em 30,66% das vacas avaliadas e em 67,09% das vacas sororreagentes. Os sorovares Wolffi (26,95%), Icterohaemorrhagiae (14,26%), Tarassovi (10,35%), Grippotyphosa (4,10%), Canicola (1,95%), Pomona (1,17%) e Autumnalis (0,19%) também foram constatados.

A predominância dos sorovares Hardjo e Wolffi concorda com MOREIRA et al. (1993), que pesquisaram rebanhos no Estado de Minas Gerais, VASCONCELLOS et al. (1997), que estudaram rebanhos das regiões Sul e Sudeste do Brasil, FAVERO et al. (2001), que avaliaram rebanhos de 21 estados brasileiros, e ARAÚJO et al. (2005), que em 39.012 amostras de soro sanguíneo de bovinos do Estado de Minas Gerais encontraram o sorovar Hardjo em 57,2% das amostras e o sorovar Wolffi em 13,2%; mas discorda de ATXAERANDIO et al. (2005), que afirmam que na região norte da Espanha o principal sorovar encontrado é o Bratislava (25,4%), seguido do Hardjo (8,2%). Na comparação entre esses trabalhos pode-se observar a variação que há de uma região para outra do planeta quanto à predominância de sorovares. ELDER et al. (1985) e GÍRIO et al. (1990) observaram uma superioridade na frequência de anticorpos contra os sorovares Wolffi e Pomona sobre o sorovar Hardjo, no entanto esses trabalhos foram realizados há mais de 16 anos, e a frequência de um ou outro sorovar pode variar com o decorrer do tempo.

Nenhum dos soros sanguíneos dos fetos analisados foi reagente à SAM, mesmo em diluições consideradas baixas, como 1/10 até 1/200. Este dado difere dos encontrados por ELLIS et al. (1982), KIRKBRIDE et al. (1989) e MOORE et al. (2003), que obtiveram, respectivamente, 41,6%, 6,73% e 5,2% de soros fetais reagentes. Ressalta-se que esses estudos foram realizados com fetos abortados naturalmente. Não houve no presente trabalho a possibilidade de comprovar se as reações sorológicas nas vacas em questão foram causadas por vacinação, porém reações sorológicas devidas à vacinação geralmente induzem títulos baixos, de até 200 (ARDUINO et al., 2004); no entanto, 20,1% dos títulos obtidos nos soros das vacas prenhas foram iguais ou superiores a 400.

Em relação à presença de leptospiras no rim, no fígado ou no conteúdo estomacal dos fetos, os resultados dos testes utilizados foram contraditórios, pois nenhuma amostra foi positiva na PCRm, mas foram confirmados três isolamentos de leptospira pela mesma técnica, dois em rim e um em fígado de diferentes fetos.

Embora teoricamente a técnica de PCR possa detectar até uma única bactéria (MÉRIEN et al., 1993), a quantidade de material processado é muito pequena, e corre-se o risco de não conter nenhuma leptospira; no entanto, após o cultivo (quando se utiliza uma quantidade maior do material que se pretende avaliar), a concentração de leptospiras aumenta, o que eleva a possibilidade de existir pelo menos uma leptospira, que será amplificada na reação de PCR.

O fato de fetos não sororreagentes pela técnica de SAM apresentarem *Leptospira* spp. em algum órgão também foi observado por KIRKBRIDE et al. (1989). Foram encontradas alterações patológicas macroscópicas nos rins de três fetos, no fígado de 30 e no conteúdo estomacal de 70 fetos de vacas soropositivas (95 animais), enquanto nos fetos de vacas soronegativas (118 animais) não foram observadas alteração nos rins; apenas cinco fetos apresentaram fígados hemorrágicos e friáveis e seis apresentavam alguma anomalia de conteúdo estomacal. Além dos órgãos fetais, as placentas de vacas sororreagentes apresentaram mais patologias (32) que as de vacas soronegativas (16). Essas alterações também foram encontradas por ELLIS et al. (1986), KIRKBRIDE et al. (1989), SMYTH et al. (1999), MOORE et al. (2003) e ATXAERANDIO

et al. (2005). Os dados obtidos levam a acreditar que em muitos casos, mesmo com a mãe sororreagente, o feto pode não desenvolver anticorpos, mas albergar as leptospiros em seus órgãos.

A avaliação das placentas não indicou a presença de leptospira pelo cultivo e nem pela PCR, e dos 95 animais sororreagentes apenas 32 apresentaram placentas disformes ou hemorrágicas, resultado sugestivo de que em alguns casos, mesmo em um animal com título 1.600, a placenta pode não estar comprometida.

Para brucelose foram encontradas 50 fêmeas sororreagentes na prova do AAT (9,76%), e 34 (6,64%) foram comprovadas pela técnica do mercaptoetanol com títulos até 1.600, resultados que se apresentam superiores à média mundial de 5% (DEL CAMPO et al., 1987; EAGLESOME & GARCIA, 1997), e à média nacional de 4,79%, mas compatíveis com a média de 7,5% da região Sudeste do Brasil em pesquisa realizada há mais de 30 anos (ANSELMO & PAVEZ, 1977).

No Estado de São Paulo, na década de 70, foi registrado que 6,73% dos animais eram sororreagentes, e que 22,7% dos rebanhos estavam afetados; outros estudos mostram que para os dias atuais 6,60% de animais sororreagentes para brucelose é considerado um coeficiente alto. POMPEI et al. (2002) encontraram uma prevalência de 1,11% no Estado de São Paulo, e MURAKAMI (2003), estudando animais da região Nordeste do Estado, encontrou uma taxa de 2,12% de animais soropositivos.

Mesmo com um pequeno percentual de animais analisados e impossibilidade de confirmação de reação vacinal, o resultado é preocupante do ponto de vista de saúde pública, uma vez que as lesões causadas por brucelas nos bovinos são quase sempre inaparentes na inspeção e muitos funcionários de frigoríficos não utilizam as proteções adequadas, expondo-se ao risco de contágio, levantando-se a questão da necessidade de incluir no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) a obrigatoriedade de os frigoríficos receberem, para o abate rotineiro, animais com o atestado negativo no teste sorológico para diagnóstico de brucelose, e um comprometimento dos mesmos oferecerem o trabalho de abate sanitário dos animais sororreagentes. Sem isso, aumenta o risco de proprietários e veterinários enviarem, para o abate normal, animais sabidamente reagentes, o que já pode estar

acontecendo, tendo em vista a elevada porcentagem de vacas soropositivas encontradas neste estudo em relação à média encontrada nos estudos.

Nenhum dos soros fetais apresentou reação ao teste de triagem (AAT), e a avaliação do estado morfológico dos órgãos ficou prejudicada pelo pequeno número de fetos provenientes de vacas soropositivas para *Brucella* spp. e soronegativas para *Leptospira* spp.; das 14 vacas brucélicas prenhas apenas seis foram negativas para leptospirose. A presença de *Brucella* spp. não foi verificada em nenhuma das amostras clínicas avaliadas (pulmão, baço e conteúdo estomacal dos fetos e placenta das fêmeas) pelas técnicas de cultivo ou PCR. Os 13 cultivos de *Brucella* spp. com suspeita de isolamento não foram confirmados pela mPCR LepBru (técnica adotada para verificação).

Embora seja de conhecimento global que as técnicas de reprodução monitoradas melhoraram a qualidade e a produtividade de rebanhos em todo mundo e que essas técnicas (FIV, PIV, TE) vem sendo cada vez mais utilizadas, as pesquisas analisando qualidade sanitária dos rebanhos e a condição de oócitos e embriões ainda são escassas, principalmente no Brasil.

Em relação aos agentes infecciosos que poderiam aderir à ZP, STRINGFELLOW et al. (1991) encontraram o herpesvírus-4 bovino (BHV-4), o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBRV), o vírus da peste bovina (RPV), o vírus da estomatite vesicular (VSV), o *Haemophilus sommus*, o *Mycoplasma bovis*, o *M. bovis genitalium*, o *Mycobacterium paratuberculosis* e o *Ureaplasma diversum*. No mesmo estudo eles afirmam que a *Brucella abortus* não teria capacidade de aderir à ZP, no entanto, no presente trabalho foi encontrado, por meio da prova de PCRm, DNA de *Brucella* spp. em células do “cumulus oophorus” provenientes de vacas sororreagentes para brucelose. Também foi encontrado DNA de *Brucella* spp. em sete “pools” de líquidos foliculares provenientes de cinco colheitas, e em meio de crescimento Fletcher contendo “pools” de líquido folicular de cinco colheitas. O fato de um meio próprio para o crescimento de *Leptospira* apresentar DNA de *Brucella* spp. pode ser justificado pelo fato do meio em questão (Fletcher) ser muito rico, propiciando o crescimento de outros

microorganismos além da *Leptospira* spp. e pelo fato de muitos animais serem reagentes para as duas enfermidades em questão.

A presença de *Leptospira* spp. aderida à zona pelúcida ainda é questionável, mas alguns trabalhos, como os desenvolvidos por Bielanski et al. (1998) e Bielanski & Surujballi (1998), indicaram a possibilidade da transmissão de leptospira por meio das técnicas de TE ou PIV, são eles a detecção de DNA de *Leptospira* em oócito recolhido de vaca experimentalmente infectada e de embriões em estágio de mórula e blastocisto, a visualização, por meio de microscopia de varredura, de leptospiros aderidas à superfície e aos poros de embriões em estágio de mórula, e a visualização, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, de leptospiros na matriz e nos canais da ZP. Esses resultados concordam com os encontrados na presente pesquisa. Foi possível detectar DNA de *Leptospira* em quatro “pools” de líquido folicular e em cinco das 10 amostras de cultivo em meio Fletcher contendo “pools” de líquido folicular. Além da presença de leptospiros no líquido folicular foi possível detectar DNA de leptospiros em uma amostra de células do “cumulus oophorus” lavados cinco vezes e provenientes de vacas sororreagentes a leptospirose e em outra amostra, de oócitos desnudos maturados em meio contaminado com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e sem estreptomicina e penicilina, mas com gentamicina e lavados cinco vezes.

Embora não existissem leptospiros aderidas aos oócitos, a mobilidade das mesmas caiu em torno de 50% com a utilização de gentamicina e em torno de 80 a 90% com a utilização da penicilina e da estreptomicina.

Esses resultados sugerem a possibilidade da transmissão de leptospirose e brucelose por meio das técnicas de produção de embriões “in vitro”, caso não sejam tomadas medidas sanitárias adequadas e os devidos cuidados durante a manipulação dos oócitos e dos embriões.

Brandespim et al. (2004) consideraram a técnica de Levaditi mais eficaz no diagnóstico de *Leptospira* que a técnica de imunoistoquímica, porém no presente estudo não foi possível detectar leptospiros nos oócitos por nenhuma das duas técnicas de coloração empregadas.

7 – CONCLUSÃO

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

1. Não se conseguiu obter isolamento de *Brucella* spp. por meio de cultivo em meio brucela-agar a partir de conteúdo estomacal, pulmão e baço de fetos e placenta de vacas sororreagentes abatidas em frigorífico.
2. Foi realizado o isolamento de *Leptospira* spp. por meio do cultivo em meio Fletcher a partir de dois rins e um fígado de fetos distintos.
3. Não foi possível verificar a presença de *Leptospira* spp. em placentas de vacas sororreagentes.
4. Foi possível detectar a presença de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em líquido folicular pelas técnicas de PCRm e cultivo.
5. Não foi possível localizar as leptospiros nos oócitos, utilizando-se as técnicas de observação direta em microscopia de campo escuro, Levaditi e imunoistoquímica.
6. Oócitos maturados em meio contaminado com estirpe virulenta de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona sem a adição de estreptomicina e penicilina têm maior risco de apresentar leptospiros aderidas.
7. A mobilidade das leptospiros caiu em torno de 50% com a utilização de gentamicina e em torno de 80 a 90% com a utilização da penicilina e da estreptomicina, dificultando a aderência das bactérias com a adição dos antibióticos.
8. Foi detectado DNA de *Leptospira* em uma amostra de células do “cumulus oophorus” lavados cinco vezes e proveniente de vacas sororreagentes para leptospirose e em outra amostra, de oócitos desnudos maturados em meio contaminado com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e sem estreptomicina e penicilina, mas com gentamicina e lavados cinco vezes.

9. Foi detectado DNA de *Brucella* em uma amostra de células do “cumulus oopharus” lavados cinco vezes e provenientes de vacas sororreagentes para brucelose.

8 – REFERÊNCIAS*

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. v. 1. Bacteriosis y micosis. 3 ed. Washington: OPS, 2001. 398 p.
- AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F.; PATH, M. R. C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, v. 45, n. 12, p. 875 – 891, 1975.
- ANSELMO, F. P.; PAVEZ, M. M. Brucelose bovina. In: _____ **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília; Ministério da Agricultura, 1977. p. 525-561.
- 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 sangüíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n. 4, p.430-435, 2005.
- ARDUINO, G. G. C.; GÍRIO, R. J. S.; FREIRE, M. M.; MARCHIORI FILHO, M. Anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial. Perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.865-871, 2004.
- ATXAERANDIO, R.; ADURIZ, G.; ZILUAGA, I.; ESTEBAN, J. I.; MARANDA, L.; MAINAR-JAIME, R. C. Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. **Veterinary Record**, v.156, p.376-380, 2005.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; SOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 95, p. 271-275, 1992.

* De acordo com normas da ABNT - 2006

BANE, D. P.; JAMES, J. E.; GRADIL, C. M.; MOLITOR, T. W. In vitro exposure of preimplantation porcine embryos to porcine parvovirus. **Theriogenology**. v. 33, n. 1, p. 553-561, 1990.

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

BARRIOS, D. R.; KRAEMER, D. C.; BESSOU, E.; ADAMS, L. G. Failure to isolate *Brucella abortus* from embryos or ova from culture-positive superovulated cows. **Theriogenology**. v. 30, n. 3, p.353-361, 1987.

BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária Ltda., 1980. 325p.

BIELANSKI, A. B.; SURUJBALLI, O. *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type *hardjobovis* in bovine embryos fertilized in vitro. **Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne de Recherche Veterinaire**. V. 62, n. 3, p. 234-236, 1998.

BIELANSKI, A.; SURUJBALLI, O.; GOLSTEYN, T. E.; TANAKA, E. Sanitary status of oocysts and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjobovis*. **Animal Reproduction Science**. v. 54, n. 2, p. 65-73, 1998.

BLENDEN, D. C. **Aspectos Epidemiológicos de la leptospirose**. In: Organização Mundial de Saúde. Reunion Interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis. Publicacion Cientifica, n. 316, p. 160-168, 1975.

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

BOWEN, R. A.; ELSDEN, R. P.; SEIDEL, G. E. Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 1095-1097, 1985.

BRANDESPIM, D. F.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S.; LOPES, F. L.; NÜRMBERGER JR., R.; ALESSI, A. C. Avaliação das técnicas de Levaditi e imunoistoquímica na detecção de *Leptospira interrogans* sorovar *pomona* em órgãos reprodutores de hamsters machos infectados experimentalmente. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.3, p.177-183, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Saúde Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCETB). **Manual técnico**, Brasília, DF. 2006. 184p.

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

BRYAN, H. S.; BOLEY, L. E. STUDIES OF LEPTOSPIROSIS IN DOMESTIC ANIMALS. IV. SURVIVAL OF LEPTOSPIRA POMONA IN SEMEN EXTENDER. PROCEEDINGS OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, p. 371, 1975.

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

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

Chomkzynski, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, p.532-537, 1993.

CORNER, L. A.; ALTON, G. G.; IYERT, H. Distribution of *Brucella abortus* in infected cattle. **Australian Veterinary Journal**. v. 64, n. 8, p. 241-244, 1987.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v.79, n.7, p.500-501, 2001.

DEL CAMPO, M. R.; TAMAYO, R.; DEL CAMPO, C. H. Embryo transfer from brucellosis-positive donors: a field trial. **Theriogenology**. v. 27, n. 1, p. 221, 1987.

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; ELLIS, W. A. Reproductive performance of dairy herds infected with *L. interrogans* sorovar *hardjo* relative to the year of diagnosis. **Veterinary Record**, v. 138, p. 272-276, 1996.

DUNBAR, B. S. **Morphological, biochemical, and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida**. In: Hartman, JF (ed). Mechanisms and control of animal fertilization. p. 139-175, Academic Press, New York, 1983.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. **Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizzoties**. V. 16, n. 1, p. 215-225, 1997.

ELDER, J. K.; PEPPER, P. M.; HILL, M.W.; WARD, W. H. The significance of leptospiral titres associated with bovine abortion. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 8, p. 258-262, 1985

ELLIS, W. A.; O'BRIEN, J. J.; NEILL, S. D.; HANNA, J. Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. **Veterinary Record**, v.20, n.2, p.178-80, 1982.

ELLIS, W. A.; SONGER, J. G.; MONTGOMERY, J.; CASSELLS, J. A. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in genital and urinary tracts of no pregnant cattle. **Veterinary Record**, London, v.118, n.1, p.11-13, 1986.

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

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 1994 em rebanhos de 21 Estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n.2, p.29-35, 2001.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**. v. 59, n. 2, p. 599-616, 2003.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 30, n.2, p. 107-112, 1993.

GIRIO, R. J. S.; SILVA, R. A. P.; FRANCESCHINI, P. H.; SCHALCH, U. M.; SCHALCH, F. J. Estudo da possível influência da leptospirose sobre determinadas características reprodutivas em fêmeas bovinas leiteiras. **Ciência Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 7-8, 1990.

GIVENS, M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, v.66, n.3, p.648-654, 2006.

GUIMARÃES, M. C. **Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e o seu controle terapêutico**. 1982, 50p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

GUTIÁN, F. J.; GARCÍA-PEÑA, F. J.; OLIVEIRA, J.; SANJUÁN, M. L.; YUS, E. Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. **Veterinary Microbiology**. v. 80, n. 3, p. 275 – 284, 2001.

GWATKIN, R. B. L. Passage of Mengovirus through the zona pellucida of the mouse morula. **Journal of Reproduction and Fertility**. V. 13, p. 577-578, 1967.

HAFEZ, E. S. E. REPRODUÇÃO ANIMAL. 6. ED. SÃO PAULO: MANOLE, 1995. 582P.

HANSON, L. E. LEPTOSPIROSIS IN DOMESTIC ANIMALS: THE PUBLIC HEALTH PERSPECTIVE. JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, v.181, n.12, p.1505-9, 1982.

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

HIGGINS, R. J.; HARBOUNE, J. F.; LITTLE, T. W. A.; STEVENS, A. E. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of serotype *hardjo*. **Veterinary Record**, v. 27, n. 9, p. 307 – 309, 1980.

HOAG, W. G.; BELL, W. B. IN VITRO STUDIES ON THE ACETINO OF STREPTOMYCIN UPON FIVE SEROTYPES OF LEPTOSPIRA GROWN IN TWO TYPES OF MEDIUM. AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, v.4, p.251–254, 1955.

HONG, C. B.; DONAHUE, J. M.; GILES JR., R. C.; POONACHA, K. B.; TUTTLE, P. A.; CHEVILLE, N. F. *Brucella abortus* associated meningitis in aborted bovine fetuses. **Veterinary Pathology**, v.28, p.492-496, 1991.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY. Subcommittee on Taxonomy of *Brucella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 450-452, 1988.

JONES, R. K. Study of the viability of *Leptospira pomona* in frozen extended bovine semen. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 133, n. 4, p.216-218, 1958.

KIRKBRIDE, C. A.; JOHNSON, M. W. Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhea, and

leptospirosis infections. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, n. 2, p. 132-138, 1989.

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

KOLEV, V.; VENEV, S.; MARKARIAN, M.; DABEV, I. Intrauterine bacterial and mycotic infections in cows. **Veterinary Medical Nauki**. v. 20, n. 2, p. 33-40, 1983.

LANGONI, H.; SOUZA, L. C.; SILVA, A. V.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PAES, A. C.; LUCHEIS, S. B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n.3-4, p. 271-275, 1999.

LOPES, F. P.; ROTH, ZVI; JOUSAN, F. D.; SOTO, P., HANSEN, P. J. **Tunel procedure in bovine embryos**. Disponível em <<http://www.animal.un.edu/nansen/protocols/tunel.htm>> Acesso em 10 de dezembro de 2002.

LÓPEZ, A.; HILTOS, F.; PÉREZ, A.; NAVARRO-FIERRO, R. R. Lung lesions in bovine aborted by *Brucella abortus*. **Canadian Journal Complement Medicine**, v. 48, p.275-277, 1984.

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

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

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SANINT-GIRONS, T. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 30, p. 2219-2224, 1993.

MICHNA, S. W. Leptospirosis. **Veterinary Record**, v.86, p.484-496, 1970.

MIRAGLIA, F. **EMPREGO DA PENICELINA-ESTREPTOMICINA, AMOXICILINA, OU CEFTIOFUR SÓDICO NO DILUIDOR GEMA-CITRATO, PARA DESTRUIR LEPTOSPIRAS EM SÊMEN BOVINO EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADO POR LEPTOSPIRA SANTAROSAI SOROVAR GUAICURUS**. 2001. 82P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL E APLICADA A ZOONOSES) – FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, 2001.

MOORE, D. P.; CAMPERO, C. M.; ODEON, A. C.; BARDON, J. C.; SILVA-PAULO, P.; PAOLICCHI, F. A.; CIPOLLA, A. L. HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO INFECTIOUS AGENTES IN ABORTED BOVINE FETUSES IN ARGENTINA. **REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGIA**. v.35, N.3, p.143-148, 2003.

MOREIRA, E. C.; SILVA, J. S.; VIANA, F. C.; ANSELMO, F. P. Leptospirose bovina: aglutininas antileptospira em soros sangüíneos de bovinos em Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**. v. 31, p. 375-378, 1993.

MURAKAMI, T. O. **Epidemiologia da brucelose bovina nos municípios de Altinópolis e Santo Antônio da Alegria, Estado de São Paulo. Prevalência, fatores de risco e métodos de diagnóstico**. 2003. 78 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

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

OIKAWA, T.; SENDAI, Y.; KURATA, S.; YANAGIMACHI, R. A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of zona pellucida of hamster egg. **Gamete Research**. v. 19, p. 113-122, 1988.

- OLIVEIRA, S. J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? **Hora Veterinária**, v. 19, p. 87 – 90, 1999.
- PAULIN, L. M.; FERREIRA, J. S. **Combate à Brucelose Bovina: Situação Brasileira**. FUNEP, Jaboticabal, 2003.154p.
- PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **Brazilian Veterinary Journal** v.149, n. 4, p. 339-369, 1993.
- POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P., Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.55-62, 2002.
- POMPEI, J. C. A.; CAMPANHA, R. C.; GOTTARDO, D. J.; ISHIZUKA, M. M. Levantamento soroepidemiológico da brucelose bovina em São Paulo. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade brasileira de Medicina Veterinária, 2002. CD-ROM.
- REBHUN, W. C. **Diseases of Dairy Cattle**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p. 472 – 474.
- RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E. P.; GENOVEZ, M. É. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiolgy**, v. 87, n. 2, p. 139-147, 2002.
- Rexroad, C. E.; Casida, L. E.; Tyler, W. J. Crow-rumpf length of fetuses in purebred holstein-friesian cows. **Journal of Dairy Science**. v. 57, n. 3, p. 346-347, marc.1974.
- RIDDELL, M. G.; STRINGFELLOW, D. A.; WOLFE, D. F.; GALIK, P. K.; LAUERMAN, L. H. Seroconversion of recipient ewes after transfer of ova exposed to *Brucella ovis* in vitro. **Theriogenology**. v. 34, n. 5, p.522-527, 1990.
- ROBERTS, S. J. A study of leptospirosis in a large artificial insemination stud. **Cornell Veterinarian**, v. 48, p. 363 – 371, 1958.

RODRIGUES A. L. B.; GIRIO, R. J. S.; ESPER, C. R.; RODRIGUES, L. H.; MAGAJEVSKI, F. S.; OLIVEIRA, M. A. Sobrevivência da *Leptospira interrogans* sorovariedade *pomona* em sêmen bovino experimentalmente contaminado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.636-643, 2003

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

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

SELLENS, M. H.; JENKINS, E. J. Permeability of the mouse zona pellucida to immunoglobulin. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 42, p. 153-157, 1975.

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

SMYTH, J. A.; FITZPATRICK, D. A.; ELLIS, W. A. Stillbirth / perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. **Veterinary Record**. v. 145, n. 19, p. 539-542, 1999.

STRINGFELLOW, D. A.; RIDDELL, K. P.; ZUROVAC, O. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 39, p. 8-17, 1991.

STRINGFELLOW, D. A.; WOLFE, D. F.; LAUERMAN, L. H.; SPARLING, P. H. Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with *Brucella abortus*. **American Journal of Veterinary Research**. v. 47, n. 9, p. 1924-1927, 1986.

STRINGFELLOW, D. A.; WRIGHT, J. C. A review of the epidemiologic aspects of embryo transfer from *Brucella abortus* – infected cows. **Theriogenology**. v. 31, n. 5, p.997-1006, 1989.

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

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JR., O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, 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 à abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, n.2, p. 7-15, 1997.

WASSARMAN, P. M. Zona pellucida glycoproteins. **Annual Review of Biochemistry**. v. 57, p. 415-442, 1988.

ANEXO

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

1. Preparo da solução-substrato com DAB

<u>Solução A</u> :	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	50 μ L
	q.s.p.	6.000 μ L
<u>DAB</u> :	Solução A	200 μ L
	DAB	100 μ L
	Tampão fosfato-salina (PBS)	1.700 μ L

2. Solução corante hematoxilina de Harris

Hematoxilina cristais.....	5 g
Álcool absoluto.....	50 mL
Sulfato de alumínio potássio ou de amônio.....	100 g
Água destilada	1000 mL
Óxido vermelho de mercúrio	2,5 g

3. Solução de nitrato de prata

Nitrato de Prata	2 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

4. Solução redutora

Ácido pirogálico	4 g
Formol puro	5 mL
Água destilada.....	q.s.p. 100mL

5. Solução tamponada da Sörensen pH 7,5

Fosfato dissódico anidro.....	8,33g
Fosfato monopotássico.....	1,09g
Água destilada.....	1.000mL

6. EMJH (Difco – 0987-01)

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

7. Fletcher (Difco – 0987-01)

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

8. TE pH 7,4

Tris HCl 10mM

EDTA 1mM (Ethylenediaminetetracetic acid – sal)

9. TNE 5x pH 8,0

Tris 50mM

NaCl 500mM

EDTA 125mM

10. Solução tampão de eluição (TE)

Tris HCl pH 7,5 10mM

EDTA 1mM

11. Tampão de corrida TBE ph 8,0

Tris acetato 0,004M

EDTA 0,001M

12. Gel de agarose 2,0%

Tampão TBE (0,5 x).....100mL

Agarose.....2,0g

13. Solução PBS (Tampão fosfato salina)

NaCl.....8,0gr

KCl.....0,2gr

Na₂HPO₄.....1,15gr

KH₂PO₄.....0,2gr

CaCl₂.....0,1gr

MgCl₂.6H₂O.....0,1gr

Piruvato de sódio.....0,036gr

Glucose.....1,0mL

BSA.....4,0mL

Garamicina.....3,5mL

H₂O q.s.p.1L

14. Solução de pronase 0,5%

Pronase (Sigma®).....0,05gr

PVA (álcool polivinil - Sigma®).....0,01gr

PBS - Ca Free.....10mL

Resultados da pesquisa de aglutininas anti-leptospira e anti-brucella de todas as vacas avaliadas por dia de colheita. Obs: legenda apenas na primeira tabela.

1. Colheita dia 01/03/05 (fetos) = TODOS OS 10 ANIMAIS NEGATIVOS

2. Colheita dia 15/03/05 (fetos)

Nº	AAT	SAL*	ME*	B	L	W*	H*	I*	P*	G*	C*	T*	A*
01													
02					P	100	100						
03													
04	P	25	25	N									
05					P	200	50						
06													
07													
08													
09													
10													

AAT: antígeno ácido tamponado
 SAL: soroaglutinação lenta em tubo
 ME: prova do 2 mercaptoetanol
 B: resultado para bruceose
 L: resultado para leptospirose
 Ø ou N: negativo
 P: positivo
 *: resultado em título
 W: sorovar Wolffi
 H: sorovar Hardjo
 I: sorovar Icterohaemorrhagiae
 P: sorovar Pomona
 G: sorovar Grippotyphosa
 C: sorovar Canicola
 T: sorovar Tarassovi
 A: sorovar Autumnalis

3. Colheita dia 06/04/05 (fetos)

[illegible]

4. Colheita dia 07/04/05 (fetos)

Nº	AAT	SAL	ME	B	L	W	H	I	P	G	C	T	A
01					P	200	800	200					
02					P		200	200					
03													
04													
05													
06													
07													
08													
09					P			200					
10													
11													
12													
13													
14					P	400	50						
15													
16													
17					P	800							
18					P	100	50						

5. Colheita dia 12/04/05 (fetos)

Nº	AAT	SAL	ME	B	L	W	H	I	P	G	C	T	A
01	P	200	400	P									
02	P	50	50	P									
03													
04					P		200	50					
05													
06					P	800	800						
07	P	50	100	P	P	100	200						
08													
09													
10					P		200	50					
11													
12													
13													
14													
15					P		100						
16													
17													
18													
19													
20													
21	P	200	400	P	P		100						
22	P	200	400	P	P		200						
23													
24					P	400	400						
25													
26													
27													
28					P		50						

6. Colheita dia 13/04/05 (fetos)

Nº	AAT	SAL	ME	B	L	W	H	I	P	G	C	T	A
01					P	100	100	50					
02					P	100	50						
03					P	50	100						
04					P	50	50						
05													
06					P	50	50	100					
07					P		50						
08					P		50						
09													
10					P	200	100						
11	P	200	400	P	P	50	200						
12													
13					P			100					
14													
15					P		50						
16					P	400	200	50					
17													
18					P	100	100						
19													
20					P	100	400	100					
21													
22					P		50						
23					P	400	200						
24													
25	P	N	N	N	P	200							
26													
27					P	50							
28					P		200						

7. Colheita dia 05/05/05 (fetos)

Nº	AAT	SAL	ME	B	L	W	H	I	P	G	C	T	A
01					P	100	200	100					
02					P			400					
03													
04					P	50	50	100					
05					P	100	100	400					
06					P	200	400	100					
07	P	25	50	P	P	200	200	50					
08	P	N	N	N	P		50	100					
09					P		50	200					
10					P		100	50					
11					P	50	200	50	100				
12					P		400	200					
13					P		100	50					
14					P	50	200						
15													
16					P	50	800	200		200			
17					P			100					
18					P	50	200	50					

9. Colheita dia 12/05/05 (fetos)

Nº	AAT	SAL	ME	B	L	W	H	I	P	G	C	T	A
01													
02					P	100	200	50					
03					P	50	100	100					
04													
05					P	100	100	200					
06													
07					P	50	100	400					
08					P		50						
09					P			100					
10	P	N	N	N									
11	P	N	N	N	P			100					
12					P		100	100					
13					P	400	400						
14					P		100	100					
15													
16	P	50	50	P	P		50						
17													
18					P	800	400						
19													
20					P		100						
21													
22													
23					P			100					
24													
25	P	N	25	N	P		200						

14. Colheita dia 26/10/05 (ovários)

[illegible]

16. Colheita dia 19/09/06 (ovários)

Nº	AAT	SAL	ME	B	L	W	H	I	P	G	C	T	A
01													
02					P	1.600	100			100			
03													
04													
05													
06					P			50				50	
07					P	1.600	400					50	
08	P	400	400	P									
09													
10					P			50					
11					P	800	100	50					
12					P							100	
13					P					200	50	50	
14													
15					P	800	100					200	
16					P						100	800	
17					P						100	100	
18					P		50			200			
19													
20					P							100	
21	P	400	400	P									
22													
23					P			50				400	
24					P	200	100	50					
25					P	400	1.600					800	
26													
27	P	50	50	P	P	200	100	50				50	
28					P							100	
29					P	800	800					50	
30					P	200	800	50				50	

17. Colheita dia 26/09/06 (ovários)

Nº	AAT	SAL	ME	B	L	W	H	I	P	G	C	T	A
01					P	100		50		100		100	
02													
03													
04					P							100	
05													
06					P	400	100	200				100	
07					P	200	400	50		200			
08	P	200	200	P	P	200	200			100		50	
09					P							200	
10					P					100		200	
11													
12	P	800l	800l	P									
13	P	50	50	P	P				50				
14	P	100	N	I	P			50				400	
15													
16					P	100	100						
17													
18					P	800	50	100					
19					P	200	100			200			
20					P		200					100	
21					P	100						400	
22													
23					P		200						
24					P	200	100					200	
25					P		200					200	
26	P	1.600	1.600	P	P	100	50						
27													
28													
29					P							100	
30													

I: Inconclusivo

18. Colheita dia 17/10/06 (ovários)

Nº	AAT	SAL	ME	B	L	W	H	I	P	G	C	T	A
01					P	100					200		
02													
03													
04													
05													
06													
07					P					100			
08													
09					P	400	100	50					
10													
11													
12					P	400	200						
13													
14													
15					P			50					
16													
17					P					50			
18	P	200	200	P	P	100				100			
19													
20	P	400i	200	P									
21													
22					P			100					
23													
24													
25													
26					P	50	50						
27													
28													
29													
30					P	800	50						

