

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

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA
Leptospira spp. EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DO CENTRO
OESTE PAULISTA**

Aluno: Marcelo Augusto Orsi Dutra

Botucatu – SP
Junho2019

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

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA
Leptospira spp. EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DO CENTRO
OESTE PAULISTA**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária - FMVZ-UNESP-Botucatu para
obtenção do título de mestre
Área: Saúde Animal, Saúde Pública
Veterinária e Segurança Alimentar

Aluno: Marcelo Augusto Orsi Dutra
Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Co-orientadora: Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Botucatu – SP
Junho/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Dutra, Marcelo Augusto Orsi.

Avaliação sorológica e diagnóstico molecular para
Leptospira spp. em bovinos abatidos em frigorífico do Centro
Oeste Paulista / Marcelo Augusto Orsi Dutra. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros

Capes: 50502050

1. *Leptospira*. 2. Leptospirose. 3. Bovinos - Doenças -
Diagnóstico. 4. Frigoríficos.

Palavras-chave: *Leptospira* spp.; Leptospirose; bovinos;
diagnóstico; frigorífico.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Dra. Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof Dr. Hélio Langoni

Membro da Banca

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ- UNESP- Botucatu

Profª Adjunto Márcia Marinho

Membro da Banca

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

FMVA- Unidade Faculdade de Medicina Veterinária

Data da Defesa: 26 de Abril de 2019.

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos meus pais Fábio Antonio Brígido Dutra e
Maria Lucília Fernandes Orsi Dutra por todo apoio. Muito obrigado.*

AMO VOCÊS

Agradecimientos

*Agradeço aos meus professores Dr. Hélio Langoni e Dra. Simone
Baldini Luchis por permitirem meu ingresso a este programa.*

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Municípios de procedência de 144 bovinos abatidos em frigorífico localizado na região Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.	05
Quadro 2 -	Soroaglutinação microscópica (SAM) de 144 bovinos abatidos em frigorífico da região Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.	06
Quadro 3 -	Resultados moleculares positivos para <i>Leptospira</i> spp. de 25 bovinos abatidos em frigorífico do Centro-Oeste paulista, a partir de amostras de sangue e tecidos (fígado e/ou rim) e respectivos resultados sorológicos pela técnica de SAM. Botucatu, SP, 2019.	07

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organograma de Trabalho – Provas diagnósticas para <i>Leptospira</i> spp. pelas técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR).	05
Figura 2 -	A) Materiais utilizados durante colheita a campo; B) Colheita de sangue durante o abate na calha de sangria; C) Colheita e acondicionamento das amostras de fígado; D) Colheita e acondicionamento das amostras de rins; E) Acondicionamento. Botucatu, SP, 2019.	06
Figura 3 -	A) Pesagem das amostras de fígado e rim em balança analítica. B) Retirada dos fragmentos em capela de fluxo laminar para maceração em cadinhos de porcelana. C) Maceração das amostras de tecidos em Solução Salina Tamponada pH 7,6 e colheita do sobrenadante. Botucatu, SP, 2019.	07
Figura 4 -	A) Realização da fase de Titulação – prova de Soroaglutinação Microscópica – SAM; B) Aglutinações observadas sob microscopia de campo escuro; aumento de 10X. Botucatu, SP, 2019.	08
Figura 5 -	Concentração de DNA presente em cada amostra e respectiva quantificação em espectrofotômetro (NanoVue Plus®). Botucatu, SP, 2019. Fonte: arquivo pessoal.	08
Figura 6 -	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp. em termociclador, segundo Mérien et al. (1992), utilizando os <i>primers</i> LEP1/LEP2. Botucatu, SP, 2019.	09
Figura 7 -	Visualização de controle positivo para <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Pomona (14A). Botucatu, SP, 2019.	10
Figura 8 -	Sorovares reagentes à SAM em 144 bovinos abatidos em frigorífico da região Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.	12
Figura 9 -	Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de uma amostra de sangue de bovino abatido em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de <i>Leptospira</i> spp. apresentando positividade para a amostra 132. Controle positivo: <i>Leptospira interrogans</i> sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019.	13
Figura 10 -	Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de três amostras de fígado de bovinos	15

abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 5, 6 e 10 (correspondentes aos animais 21, 22 e 30, respectivamente). Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019.

- Figura 11 - Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de duas amostras de fígado de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 2 e 4 (correspondentes aos animais 22 e 25, respectivamente). Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019. 20
- Figura 12 - Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de amostras de fígado de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. apresentando positividade para a amostra 39. Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019. 38
- Figura 13 - Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de quatro amostras de rins de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 2, 6, 7 e 21 (correspondentes aos animais 1, 5, 6 e 22, respectivamente). Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019. 39
- Figura 14 - Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de 17 amostras de rins de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. apresentando positividade para as amostras 34, 36, 39, 57, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 92, 93, 94, 98, 102, 104 e 118. Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019. 40

*Lista de Abreviaturas e
Símbolos*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1 Taxonomia e classificação.....	28
2.2 Patogenia.....	29
2.3 Epidemiologia.....	29
2.4 Importância para os bovinos.....	30
2.5 Importância para os humanos.....	31
2.6 Diagnóstico.....	31
2.6.1 Exame microscópico.....	32
2.6.2 Exames sorológicos.....	32
2.6.3 Exames moleculares.....	33
2.6.4 Justificativa.....	33
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Gerais.....	35
3.2 Específicos.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Local de realização das técnicas.....	37
4.2 Organograma de trabalho.....	37
4.3 Aspectos éticos.....	37
4.4 Procedência e quantidade de animais.....	38
4.5 Amostras biológicas.....	39
4.5.1 Colheita, acondicionamento e transporte das amostras biológicas.....	39
4.5.2 Processamento das amostras biológicas.....	40
4.6 Exames diagnósticos.....	42
4.6.1 Soroaglutinação microscópica.....	42
4.6.1.1 Triagem.....	42
4.6.1.2 Titulação.....	42
4.6.2 Exames moleculares pela PCR.....	44
4.6.2.1 Preparo das amostras para a extração do DNA.....	44
4.6.2.2 Extração e quantificação do DNA.....	44
4.6.2.3 Amplificação do DNA.....	45
4.6.2.4 Eletroforese.....	47
4.6.2.5 Controles.....	48
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
6 RESULTADOS.....	52
6.1 Soroaglutinação microscópica.....	52
6.2 Reação em Cadeia da Polimerase.....	55
6.2.1 Quantificação do DNA.....	55
6.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase.....	55
6.3. Resultados Gerais – Sorologia e PCR.....	62
7 DISCUSSÃO.....	65
8 CONCLUSÕES.....	71
9 REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	
APÊNDICE.....	

Resumo

DUTRA, M.A.O. **AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA *Leptospira* spp. EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DO CENTRO-OESTE PAULISTA.** Botucatu, SP, 2019. 52 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

A leptospirose é uma zoonose de grande importância em saúde pública, considerada antroponozoonótica com alta incidência e prevalência, negligenciada e de caráter ocupacional. Funcionários da linha de produção e manipuladores de sangue e vísceras em frigoríficos, podem infectar-se pelo contato direto com estes produtos, assim como os trabalhadores rurais nas propriedades, pelo contato e exposição direta a fômites e secreções destes animais. Esta enfermidade representa perdas econômicas importantes nos rebanhos, pois pode ocasionar abortos e fetos natimortos e, na sua forma subclínica, é comumente assintomática em bovinos. Amostras biológicas de sangue, fígado e rins de 144 bovinos abatidos em frigorífico localizado no centro-oeste paulista foram utilizadas para o diagnóstico da leptospirose com as técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) para *Leptospira* spp. Os resultados sorológicos demonstraram 71/144 (49,3%) animais reagentes à SAM para os seguintes sorovares: Djasiman (56,3%), Hardjoprajtino (40,8%), HardjoCTG (12,7%), Hardjo (11,3%), Hardjobovis (11,3%), Pyrogenes (9,8%), Wollfi (8,4%), Castellonis (7,0%), Pomona (4,2%), Grippytyphosa (1,4%), Hardjomini (1,4%), Icterohaemorrhagiae (1,4%) e Bratislava (1,4%). Os resultados moleculares evidenciaram a presença de DNA de *Leptospira* spp. em 25 animais (17,4%), sendo em rins de 21 animais, em fígado de cinco animais, em fígado e rins de dois animais e em sangue, de um (01) animal. Tais resultados indicam um alerta quanto a sanidade dos rebanhos de origem dos animais, pela possibilidade destes animais serem fontes de infecção, tanto nas fazendas quanto no frigorífico durante a linha de abate, tendo em vista o contato direto e contínuo com sangue e vísceras dos animais, demonstrando a característica ocupacional da doença. Ainda, verifica-se a importância da complementação das técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico da leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospira* spp., leptospirose, bovinos, frigorífico, diagnóstico.

Abstract

DUTRA, M.A.O. SEROLOGICAL EVALUATION AND MOLECULAR DIAGNOSIS FOR *Leptospira* spp. IN BOVINES SLAUGHTERED IN SLAUGHTERHOUSE FROM MIDWEST REGION OF SAO PAULO. Botucatu, Paulista State University.

Abstract

Leptospirosis is a zoonosis of great importance in public health, considered anthroozoonotic with high incidence and prevalence, neglected and of occupational character. Production line workers and handlers of blood and viscera in slaughterhouses can be infected by direct contact with these products, as well as rural workers on the farms, by contact and direct exposure to fomites and secretions of these animals. This disease represents important economic losses in the herds, since it can cause abortions and stillborn fetuses and, in its subclinical form, is commonly asymptomatic in cattle. Biological blood, liver and kidneys samples from 144 cattle slaughtered in a slaughterhouse located in central-western São Paulo were used for the diagnosis of leptospirosis using the Microscopic Agglutination Test (MAT) and Conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) techniques for *Leptospira* spp. The serological results showed 71/144 (49.3%) animals reactive to MAT for the following serovars: Djasiman (56.3%), Hardjoprajtin (40.8%), HardjoCTG (12.7%), Hardjo 3%, Hardjobovis (11.3%), Pyrogenes (9.8%), Wollfi (8.4%), Castellonis (7.0%), Pomona (4.2%), Grippotyphosa, Hardjomini (1.4%), Ichterohaemorrhagiae (1.4%) and Bratislava (1.4%). Molecular results evidenced the presence of *Leptospira* spp. in 25 animals (17.4%): the kidneys of 21 animals, in the liver of five animals, in the liver and kidneys of two animals and in blood of one (01) animal. These results indicate an alert to the sanity of the herd sampled, for the possibility that these animals behave as a source of infection both in the farms and in the slaughterhouse during the slaughter line, in view of the direct and continuous contact with the blood and viscera of the animals, demonstrating the occupational characteristic of the disease. Also, the importance of the complementation of the serological and molecular techniques for the diagnosis of leptospirosis is verified.

Key words: *Leptospira* spp., leptospirosis, bovines, slaughterhouse, diagnosis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de caráter global de curso agudo ou crônico que acomete diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além de humanos. A enfermidade foi descoberta na Alemanha em Heidelberg em 1870, por um médico, Dr. Adolf Weil (1848-1916), que descreveu quatro casos com sintomatologia de febre alta, icterícia grave, baço e fígado aumentados. A doença foi denominada Doença de Weil, e na época era muitas vezes fatal (BINNS; LOW, 2016). É conhecida também como, febre dos canaviais, febre dos porqueiros, além de outras.

Importante zoonose bacteriana em saúde pública, a leptospirose afeta pessoas e animais. É comum em áreas tropicais, especialmente por apresentarem clima úmido e quente, com altos índices pluviométricos e em países em desenvolvimento com recursos escassos em saúde e saneamento básico. Uma grande variedade de hospedeiros de leptospiras foi identificada, como roedores, bovinos, suínos e cães, relatados como hospedeiros e disseminadores da bactéria no meio ambiente. Não raramente é subestimada, em decorrência dos pacientes apresentarem sintomas febris, semelhantes à gripe, quadro comum de diversas doenças infecciosas, como é o caso da dengue e malária, e em decorrência do acesso ao diagnóstico laboratorial muitas vezes limitado (GUERNIER *et al.*, 2018).

Tem como agente etiológico espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira* spp., que compreendem espécies tanto saprófitas (*L. biflexa*) quanto patogênicas (*L. interrogans*). A classificação taxonômica do gênero inclui oito espécies patogênicas de leptospiras, com mais de 200 sorotipos. Para a bovinocultura, os sorovares Hardjo, Wolffi, Pomona e Grippotyphosa são os mais importantes (COSATE *et al.*, 2015).

Em rebanhos bovinos, *L. interrogans* sorovar Hardjo está diretamente associada a perdas econômicas, como insuficiência reprodutiva, incluindo o aborto, assim como eventualmente quadros de mastite, gerando grandes débitos produtivos na bovinocultura. Teoricamente qualquer sorovar pode infectar qualquer espécie animal, mas epidemiologicamente existem predileções pelos sorovares em relação às espécies infectadas. Estas predileções estão relacionadas com as condições ambientais e climáticas,

características de manejo e instalações, fatores que determinam sorovares circulantes regionais (COSATE *et al.*, 2015).

Leptospira sorovar Hardjo pertence ao sorogrupo Sejroe sendo o sorovar de maior relevância em rebanhos bovinos em todo o mundo. O sorogrupo Sejroe é freqüentemente identificado pela sorologia em rebanhos bovinos brasileiros, o que trata-se do sorovar Hardjo. Sua taxonomia apresenta, dois genótipos: Hardjobovis e Hardjoprajitno (CHIDEROLI, 2017).

Mais de 200 sorovares de leptospiros foram identificados e distribuídos mundialmente entre diversas espécies de animais de produção, companhia e animais silvestres. É uma doença que possui característica ocupacional, sendo porta de entrada do agente no organismo do hospedeiro pelo contato da pele ou mucosas com fluidos orgânicos de um animal infectado ou pela permanência em ambientes contaminados. Por essa característica, aumenta a incidência da doença para algumas atividades específicas de trabalho, tais como trabalhadores rurais, ordenhadores, trabalhadores de redes de esgoto, médicos veterinários e trabalhadores da indústria da cadeia de proteínas, como magarefes e manipuladores (DAUD *et al.*, 2018).

A infecção zoonótica se tornou muito difundida no mundo com relatos de até um milhão de casos por ano e provavelmente essa estimativa aumentará em decorrência de mudanças climáticas tornando-se a leptospirose um desafio para saúde pública (BINNS *et al.*, 2016).

Considerado como teste “ Padrão Ouro”, o manual da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda o teste de aglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose (MORI *et al.*, 2017).

Outros autores concordam que os resultados do diagnóstico baseado no ensaio da PCR, quando aplicados na identificação de *Leptospira* spp. mostram-se rápidos, sensíveis e específicos, o que demonstra ser uma ferramenta eficaz e mais precisa para o diagnóstico da leptospirose (MÉRIEN *et al.*, 1992; HAMOND *et al.*, 2014; PINNA *et al.*, 2018).

Tendo em vista a importância desta zoonose para o rebanho bovino e devido aos problemas reprodutivos associados a ela, além da sua importância pelas perdas econômicas e pela relevância em saúde pública, pretende-se com este estudo avaliar a presença de portadores em bovinos abatidos em um frigorífico da região Centro-Oeste Paulista. Pelo nosso conhecimento, não há

trabalhos semelhantes nesta região, e o presente estudo visa a identificação de animais positivos tanto na sorologia bem como pela análise molecular a partir de sangue e tecidos (fígado e rim), permitindo-se verificar animais carreadores da bactéria e a possibilidade do controle em rebanhos acometidos, pela indicação de tratamento dos animais e vacinações periódicas no rebanho e conseqüentemente, diminuição do risco de abate de animais positivos, e menor fator de risco de infecção dos funcionários durante suas atividades na inspeção de carcaças bovinas.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia e classificação

A leptospirose é uma zoonose de importância global, particularmente em países próximos a linha do Equador e Trópicos, que apresentem clima quente e úmido. É causada por uma espiroqueta altamente invasiva conhecida como leptospira. São bactérias pertencentes a ordem Spirochaetales, ocasionando leptospirose em humanos e outros mamíferos (GUERNIER *et al.*, 2018).

Para a classificação da leptospira são aceitos sorovar com o táxon básico baseado em sua sorologia ou a classificação taxonômica que identifica as espécies, também referida como genomoespécies (GUERNIER *et al.*, 2018).

O gênero *Leptospira* foi classificado inicialmente em duas espécies: *Leptospira interrogans* sensu lato (espécies patogênicas) e *Leptospira biflexa* sensu lato (espécies saprófitas). Estes dois grupos diferem na capacidade patogênica, nos requerimentos nutricionais e em outras propriedades fenotípicas (JOHNSON E ROGERS, 1964). A classificação atual é a de genomoespécies (patogênicas, intermediárias e saprófitas), sendo que as características que diferenciavam *L. interrogans* sensu lato de *L. biflexa* sensu lato não tem mais relevância (LEVETT, 2004). É composto por 12 espécies e 250 sorotipos entre cepas patogênicas e não patogênicas, sendo *Leptospira interrogans* a espécie patogênica mais comum (GARCIA *et al.*, 2018).

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

São visualizadas por microscopia de campo escuro e microscopia de contraste de fase, aparecendo como bactérias fuso-espirilares (PICARDEAU, 2013).

2.2. Patogenia

Hospedeiros como roedores (ratos, camundongos) não apresentam a forma clínica da doença e tornaram-se hospedeiros reservatórios devido a colonização da leptospiras nos túbulos renais e, portanto, podendo excretá-las pela urina, sendo fundamentais para a manutenção da bactéria na natureza e seu ciclo de vida.

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

Animais de companhia (por exemplo, cães) podem sofrer perda fetal e lesões agudas de rim, fígado e pulmão em resposta à infecção. Os sintomas em seres humanos são manifestações clínicas que podem ser assintomáticas com ou sem quadros de gripe, febre não muito pronunciada, ou como quadros mais graves, com insuficiência renal, icterícia, hemorragias, síndrome hemorrágica pulmonar grave, meningite, choque e morte (FOUTS *et al.*, 2016).

Os macrófagos desempenham função importante no desenvolvimento clínico da leptospirose por fagocitarem as bactérias, as quais, além de continuarem em replicação ainda escapam das respostas de defesa do organismo do hospedeiro por modular a resposta imune. Os microRNAs sofrem influência direta da espécie da leptospira e de sua virulência. Esses microRNAs são responsáveis pelas respostas antigênicas que por conseguinte podem ser utilizados como marcadores biológicos (GUERNIER *et al.*, 2018).

2.3. Epidemiologia

Estudos sobre a incidência e prevalência da leptospirose e respectivos sorovares, ampliam a compreensão da epidemiologia da enfermidade e fornece dados para o maior entendimento da tríade epidemiológica da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A leptospirose é uma doença zoonótica, distribuída em todo o mundo, afetando milhões de pessoas a cada ano levando a 60 mil mortes anualmente. Essas bactérias são encontradas no solo, água e são eliminadas pelos fluidos biológicos de seus reservatórios naturais. As bactérias podem

penetrar pelo contato com pele e mucosas infectando o hospedeiro (GUERNIER *et al.*, 2018).

Mundialmente, a leptospirose ocorre em variados contextos geográficos devido à diversidade de hospedeiros animais que podem albergar o patógeno. A incidência da leptospirose é alta em países que oferecem ambiente propício ao desenvolvimento da bactéria. Estima-se a incidência de leptospirose de 14 a 15 casos para cada 100.000 habitantes (Dreyfus *et al.*, 2014).

É uma doença com características ocupacionais. Segundo Daud *et al.* (2018), o tempo de contato com o mesmo meio ambiente ou local de trabalho determina a prevalência do sorovar e o título sorológico dos indivíduos submetidos à SAM.

2.4. Importância para os Bovinos

Dentre os animais de produção, os bovinos são relativamente susceptíveis à infecção clínica, apresentando uma infecção na forma subaguda que resulta em perdas reprodutivas, incluindo redução na produção de leite, falhas reprodutivas, aborto, nascimento prematuro ou natimortos (GUERNIER *et al.*, 2018). A infecção em bezerros ocasiona sinais agudos, em animais adultos apresentam sintomatologia crônica, com diminuição da produtividade e perdas econômicas, principalmente o aborto.

A cadeia produtiva da carne é um dos principais aportes da economia no Brasil e no entanto existem poucos dados sobre a relação da saúde bovina, da segurança alimentar e da disseminação da leptospirose entre os bovinos e humanos (ZARANTONELLI *et al.*, 2018).

A proximidade a centros urbanos, a inclusão de novos animais no rebanho sem protocolo sanitário adequado e sem o conhecimento do estado de saúde desses animais e a localização geográfica ou a proximidade dos animais de produção com animais silvestres possibilita a ocorrência de sorovares autóctones (GUEDES *et al.*, 2019). Os bovinos se comportam como sentinelas de leptospirose e podem infectar humanos e animais domésticos principalmente em propriedades próximas a centros urbanos (RAJALA *et al.*, 2017).

2.5. Importância para Humanos

Para humanos, a infecção apresenta sintomatologia semelhante à gripe, que pode evoluir para quadros mais graves, incluindo insuficiência renal aguda e síndrome hemorrágica pulmonar, associadas a altas taxas de letalidade. A penetração no organismo ocorre pela exposição direta ou indireta à urina de animais hospedeiros infectados que albergam o patógeno em seus túbulos renais e eliminam leptospiros patogênicas que contaminam solo, água superficial, córregos e rios. O homem é infectado por membranas mucosas, escoriações ou cortes na pele pela imersão prolongada da pele ou ingestão de água contaminada (GUERNIER *et al.*, 2018).

A taxa de mortalidade é de cerca de 60.000 mortes por ano e o número anual de casos graves pode chegar a 1 milhão, colocando a leptospirose como um fator importante na morbidade e número de mortes por causas zoonóticas (GARCIA *et al.*, 2018).

Enfermidade de grande importância em saúde pública por ser uma doença antropozoonótica com alta incidência e prevalência, muitas vezes negligenciada e que ocorre principalmente em países subdesenvolvidos com alto nível de pobreza e de regiões de clima tropical e subtropical (TORRES-CASTRO *et al.*, 2016). Destaca-se também a grande importância para saúde pública por se tratar de uma zoonose de caráter ocupacional evidenciando um grave problema, principalmente aos trabalhadores das indústrias frigoríficas.

Tendo em vista seu caráter ocupacional a leptospirose tem aumento de potencial de risco para certas categorias profissionais que aumentam o contato e exposição a animais infectados, como trabalhadores agrícolas, trabalhadores de esgotos, militares, veterinários e manipuladores de animais e produtos de origem animal, como os magarefes de empresas frigoríficas (DREYFUS *et al.*, 2014).

2.6. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da leptospirose é laborioso, podendo ser utilizadas várias técnicas que empregam métodos diretos e indiretos e os resultados baseiam-se, além da clínica e epidemiologia, muitas vezes na análise conjunta dos resultados de diversas técnicas: Microscopia de campo

escuro, de exames histológicos para visualização de *leptospiras* pelos métodos de coloração por impregnação por prata, tais como Levaditi ou Warthin Starry; prova de Soroaglutinação Microscópica; detecção de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase e isolamento do organismo em meios de cultura específicos para *Leptospira* spp. A SAM é considerada o teste imunológico de referência e de rotina em laboratórios (NILOOFA *et al.*, 2015).

Segundo Stoddard *et al.* (2009), os métodos tradicionais de diagnóstico demandam mais tempo até os resultados finais. A reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real usando uma sonda TaqMan direcionada ao lipL32, presente apenas em *Leptospira* spp. Patogênicas, tem alta especificidade e sensibilidade e pode ser um método rápido para diagnosticar a leptospirose aguda.

2.6.1. Exame microscópico

A visualização das leptospiras é possível sob microscopia de campo escuro, a partir de amostras de líquido cefalorraquidiano, urina e sangue, sendo que, o ideal para visualização seria aproximadamente 10^4 leptospiras/mL/célula/campo. Portanto, a busca de leptospiras pela microscopia de campo escuro apresenta sensibilidade e especificidade baixas (LEVETT, 2004; AHMAD E SHAH, 2005). Somado a isto, a simples detecção de espiroquetas ao exame direto não permite o diagnóstico definitivo da doença, sendo pertinente a realização de outras técnicas diagnósticas complementares, como as provas sorológicas e moleculares.

2.6.2. Exames sorológicos

Considerado como teste “Padrão Ouro”, o manual da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda realizar a Soroaglutinação Microscópica (MORI *et al.*, 2017).

O princípio da SAM é a detecção de anticorpos da classe IgM e IgG. A maior sensibilidade deste teste é durante a fase inicial da infecção. Neste período os anticorpos apresentam títulos mais elevados. Esta fase inicia-se a partir do oitavo dia de infecção quando atinge picos até a quarta semana. Entretanto anticorpos funcionais específicos do sorovar podem persistir por

vários meses. A SAM exige a manutenção periódica dos sorovares e equipes treinadas para leitura dos resultados da reação de aglutinação (NILOOFA *et al.*, 2015).

2.6.3. Exames moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase dentre os exames para detecção de micro-organismos revolucionou o diagnóstico de doenças infecciosas. Tem como princípio a amplificação de ácidos nucleicos e identificação rápida e específica em amostras clínicas. Os métodos baseados na PCR apresentam resultados com maior sensibilidade e especificidade diretamente de culturas positivas ou de amostras clínicas (BABAFEMI *et al.*, 2017).

Descrito por Mérien *et al.* (1992) o protocolo objetiva a amplificação de um fragmento de 331 pares de bases e a utilização dos *primers* LEP1/LEP2, para detecção e codificação de leptospiros.

2.6.4. Justificativa

Tendo em vista a importância da leptospirose como zoonose e o potencial risco à saúde pública, pelo seu caráter ocupacional para diferentes categorias profissionais, especialmente aos profissionais de frigoríficos, como médicos veterinários e magarefes, os quais apresentam uma contínua exposição à vísceras e secreções dos animais durante a linha de abate, justifica-se neste estudo a verificação da leptospirose em bovinos abatidos em um frigorífico localizado na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

- Avaliar o estado sanitário de bovinos de corte, abatidos em frigorífico localizado no Centro-Oeste paulista, quanto a infecção por leptospiros.

3.2. Específicos

- Verificar a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos abatidos em frigorífico a partir da Soroaglutinação Microscópica (SAM);

- Verificar a participação de bovinos sorologicamente positivos e negativos como portadores renais e/ou hepáticos de *Leptospira* spp. pela pesquisa do DNA no sangue e nesses tecidos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de Realização das Técnicas

As análises sorológicas e a pesquisa molecular foram realizadas junto ao Laboratório de Sanidade Animal de Bauru (LASAB), da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA – Pólo Centro-Oeste – Bauru-SP.

4.2. Organograma de Trabalho

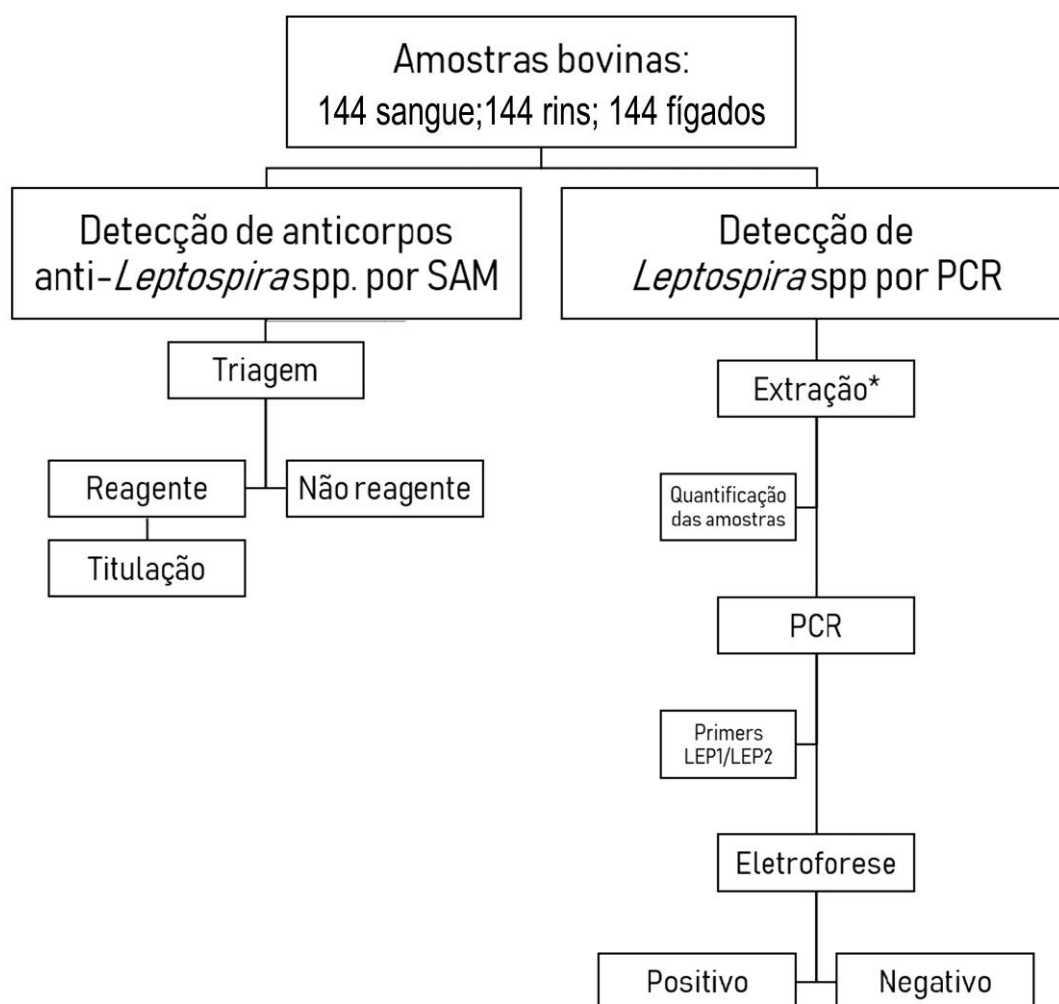


Figura 1. Organograma de Trabalho – Provas diagnósticas para *Leptospira* spp. pelas técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR).

4.3. Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado em reunião do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus Botucatu, sob número 63/2017 (Anexo 1).

4.4. Procedência e quantidade dos animais

Foram avaliados 144 bovinos, abatidos em frigorífico localizado na região Centro-Oeste paulista. A escolha dos animais foi aleatória, independente de sexo, raça e idade, considerando-se apenas animais de propriedades procedentes do Estado de São Paulo, localizados em quatorze diferentes municípios (Quadro 1). Amostras de sangue, fígados e rins de seis animais não foram processadas, tendo em vista sua perda durante o processo de colheita na linha de abate.

Quadro 1. Municípios de procedência de 144 bovinos abatidos em frigorífico localizado na região Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.

Municípios	Animais
Presidente Alves	23
Riversul	23
Itaí	17
Bariri	10
Lençóis Paulista	10
Santa Cruz do Rio Pardo	20
Vargem	10
Avaí	7
Bauru	7
Itaporanga	7
Colômbia	5
Avaré	3
Sabino	1
São José do Barreiro	1
Total	144

4.5. Amostras biológicas

4.5.1. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras biológicas

Foram colhidas amostras sanguíneas e os respectivos fragmentos de fígado e rins de 144 bovinos machos e fêmeas procedentes de frigorífico localizado na região do Centro-Oeste paulista. As amostras de sangue e fragmentos dos tecidos foram coletadas durante a linha de abate.

As amostras de fígado e rins foram colhidas com tesouras e pinças de metal esterilizadas em álcool 70% no momento de cada colheita, e os fragmentos dos tecidos eram envoltos em papel alumínio e acondicionados em caixa térmica refrigerada, transportados ao laboratório e mantidos sob refrigeração a -20°C até o momento da manipulação e posteriores processamentos.

A colheita das amostras de sangue foi procedida no momento do abate durante a sangria dos animais. Coletou-se 10mL de sangue total de cada animal em tubos de vidro com tampas de borracha, sendo um tubo com anticoagulante (EDTA ou Citrato de Sódio) para a prova da PCR; e outro tubo sem anticoagulante para a SAM.

Os tubos foram devidamente identificados com o número de cada animal e acondicionados sob temperatura de refrigeração em caixa isotérmica com gelo reciclável até a chegada ao laboratório. As amostras de sangue em EDTA foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados e mantidos sob congelamento a -20 °C até o momento de realização da extração de DNA para PCR. As amostras de sangue em tubo seco foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos e o soro foi armazenado em freezer a -20°C até o momento de realização da SAM, como visto na Figura 2:



Figura 2. A) Materiais utilizados durante colheita a campo; B) Colheita de sangue durante o abate na calha de sangria; C) Colheita e acondicionamento das amostras de fígado; D) Colheita e acondicionamento das amostras de rins; E) Acondicionamento. Botucatu, SP, 2019. Fonte: Arquivo pessoal

4.5.2. Processamento das amostras biológicas

As amostras de sangue foram acondicionadas em microtubos livres de DNase e RNase em duplicatas, com um volume total de 2 mL por amostra, identificadas e armazenadas em freezer a -20 °C.

Das amostras de tecidos, foram pesadas alíquotas de 1 grama por amostra de fígado e rim, em balança analítica e, em capela de fluxo laminar, as amostras foram alíquotadas em microtubos contendo 200 microlitros de PBS pH 7,6 e armazenadas em freezer a -20 °C até o seu processamento.

Em capela de fluxo laminar, a próxima etapa no processamento das amostras de tecidos foi a preparação dos inóculos para posterior extração do DNA. Desta forma, os fragmentos de tecidos foram retirados dos microtubos e macerados em cadinhos de porcelana estéreis. Após a maceração, adicionou-se 2 mL de Solução Salina Tamponada (SST) pH 7,6 pipetando-se 1.000 microlitros do sobrenadante para dois microtubos livres de DNase e RNase (1 mL para cada um), identificados e mantidos em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da extração de DNA. Os procedimentos podem ser visualizados na Figura 3.

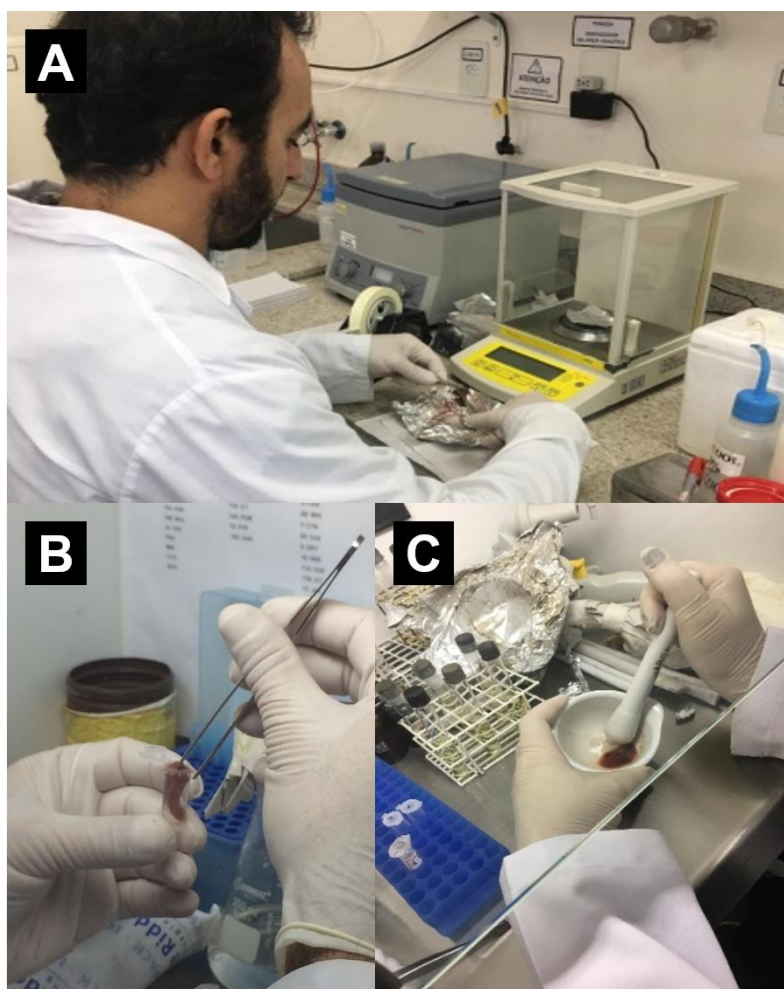


Figura 3. A) Pesagem das amostras de fígado e rim em balança analítica. B) Retirada dos fragmentos em capela de fluxo laminar para maceração em cadinhos de porcelana. C) Maceração das amostras de tecidos em Solução Salina Tamponada pH 7,6 e colheita do sobrenadante. Fonte: arquivo pessoal

4.6. Exames Diagnósticos

4.6.1. Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A técnica sorológica utilizada foi a prova de SAM segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995). Foram utilizadas uma bateria de 17 sorovares de *Leptospira* spp., específicos para herbívoros, mantidas em tubos contendo meio de cultura líquido de EMJH, acondicionadas em estufa bacteriológica entre 28°C a 30°C, faixa de temperatura ideal para o seu desenvolvimento, com quatro a 14 dias de crescimento, e que não apresentassem contaminantes e nem auto-aglutinações.

Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:50 em solução salina tamponada (SST) pH 7,6 como ponto de corte positivo e testada para os 17 sorovares de *Leptospira* spp. (Tabela 1), considerando-se como positiva aquela que apresentasse 50% ou mais de leptospiras aglutinadas em relação ao controle negativo (BRASIL, 1995). Os 17 sorovares utilizados foram mantidos por repiques semanais em meio de cultura líquido de EMJH.

O teste foi realizado em duas etapas: triagem e titulação. Todas as amostras eram submetidas à triagem, e as reagentes eram então submetidas à segunda fase, a titulação.

4.6.1.1. Triagem

1. O soro foi diluído a 1:50 (solução A), 0.1 mL da amostra em 4.9 mL de solução salina tamponada (SST) pH 7.6.

2. Em uma microplaca, previamente marcada, pipetaram-se 50 uL da solução A formando uma fileira. O número de poços preenchidos dependeu do número de sorovares testados na placa. A ação foi repetida para cada orifício dos controles negativos, mas com SST em vez do soro em teste.

3. Acrescentaram-se nos respectivos orifícios, inclusive controles, 50 uL das correspondentes suspensões antigênicas, passando a diluição final em cada orifício para 1:100.

4. Incubou-se a microplaca em estufa de 28°C a 30°C por duas horas.

4.6.1.2. Titulação

1. A partir da diluição 1:50 utilizada na prova da triagem, preparou-se mais seis diluições do soro em teste (1:100 até 1:3200).

2. Preparação em microplaca com fileiras de seis poços, cada poço correspondendo a uma diluição.

3. À parte foi preparado controle por cada antígeno (sorovar) utilizado.

4. Colocaram-se 100 uL da solução A no primeiro poço de reação de cada sorovar testado. Nos demais poços colocaram-se 50 uL de SST pH 7.6.

5. Para a obtenção das diluições, procedeu-se da seguinte forma: Pipetaram-se 50 uL da primeira diluição para o próximo poço (que continha 50 uL da SST), agindo assim sucessivamente, homogeneizando e desprezando 50 uL da última diluição. No final, todos os poços apresentaram 50 uL de suspensão (solução A + SST), correspondentes as diluições 1:50 até 1:3200 em cada fileira.

6. Pipetou-se 50 uL do antígeno (sorovar) correspondente a cada poço da respectiva fileira ao controle. Nessa etapa, as diluições passaram a ser de 1:100 até 1:3200.

7. Incubou-se a microplaca conforme descrito para a triagem.

8. Na leitura, considerou-se como título aglutinante a maior diluição do soro capaz de aglutinar no mínimo 50% de leptospiras por campo, em relação ao controle.

A Figura 4 ilustra a realização da SAM e a interpretação dos resultados de aglutinação.

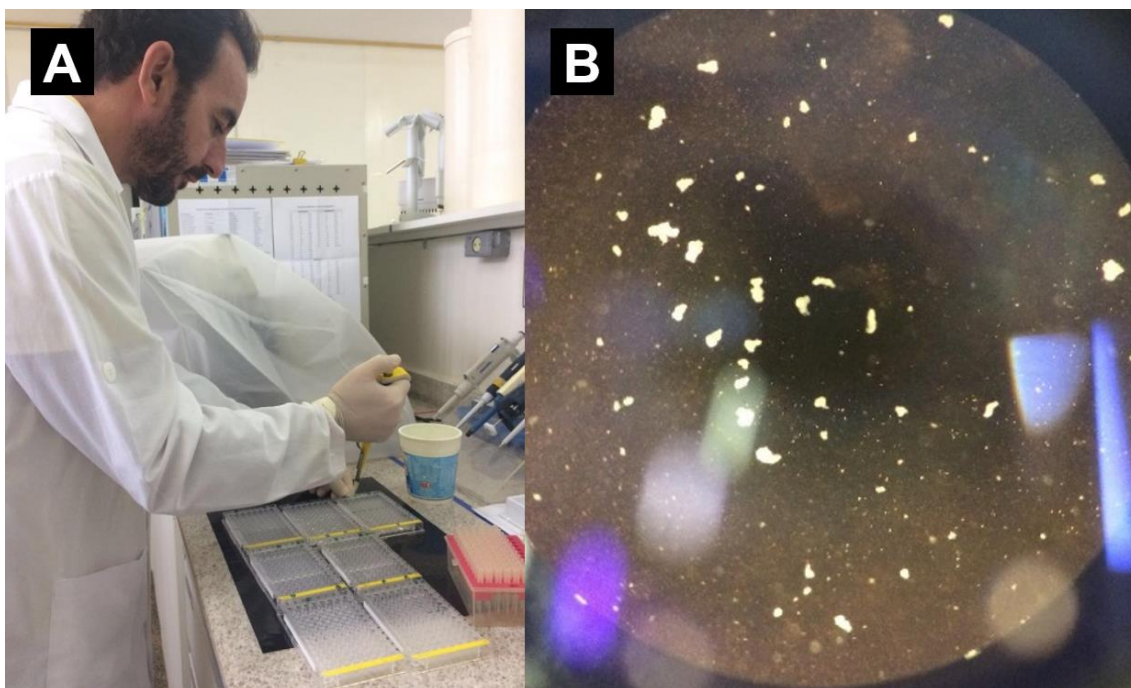


Figura 4. A) Realização da fase de Titulação – prova de Soroaglutinação Microscópica – SAM; B) Aglutinações observadas sob microscopia de campo escuro; aumento de 10X. Botucatu, SP, 2019. Fonte: arquivo pessoal

4.6.2. Exames Moleculares pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

4.6.2.1. Preparo das amostras para a extração do DNA

O sangue e tecidos (fígado e rim) colhidos dos 144 bovinos abatidos em um frigorífico localizado no Centro-Oeste paulista, foram armazenadas em microtubos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongeladas em gelo para a extração do DNA.

4.6.2.2. Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA a partir do sangue foi realizada utilizando-se o kit Illustra Blood™ genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare) e a partir das amostras de fígado e rim, foi realizada a extração de DNA utilizando-se o kit Illustra™ Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®), conforme recomendações do fabricante.

Para avaliar a concentração de DNA presente em cada amostra, foram submetidas ao aparelho de quantificação (Quantificador NanoVue Plus®). Para tanto, calibrou-se o aparelho utilizando-se 2µL de água ultrapura na cavidade indicada. Após calibração, acrescentou-se 2µL de cada amostra de DNA extraído e acionou-se a leitura para obtenção dos resultados, ou seja, da concentração de DNA de cada amostra. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda eletromagnética equivalente à 260nm, enquanto proteínas absorvem luz à 280nm.

A estimativa de pureza de DNA na amostra foi verificada pela relação de absorbância $^{260}/_{280}$. Valores desta reação entre 1,8 a 2,0 são considerados ótimos para DNA. De acordo com Silveira *et al.* (2010) os valores acima de 1,8 podem indicar excesso de proteínas (Figura 5).



Figura 5. Concentração de DNA presente em cada amostra e respectiva quantificação em espectrofotômetro (NanoVue Plus®). Botucatu, SP, 2019. Fonte: arquivo pessoal.

4.6.2.3. Amplificação do DNA

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

4.6.2.4. Eletroforese

A visualização dos produtos amplificados foi realizada pela técnica de eletroforese. Para tanto foi preparado gel de agarose a 1,5% acrescentado com 1 uL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Life Technologies). Foram utilizados 15 uL do produto de PCR e como marcadores de peso molecular 4 uL de 100 pb ladder (Invitrogen). Para todas as amostras foram acrescentados 2 uL de uma solução de Blue Juice Gel Loading (Life Technologies).

O gel foi submetido a corrida eletroforética em uma cuba horizontal HE33 (Amershan Biosciences) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09mL de ácido bórico e 0,001M de EDTA) e a voltagem de 80V por 50 minutos, utilizando a fonte Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE-Healthcare). O gel foi visualizado no transluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema Major Science™ foi documentada utilizando-se o software Vision Works LS (Figura 7).

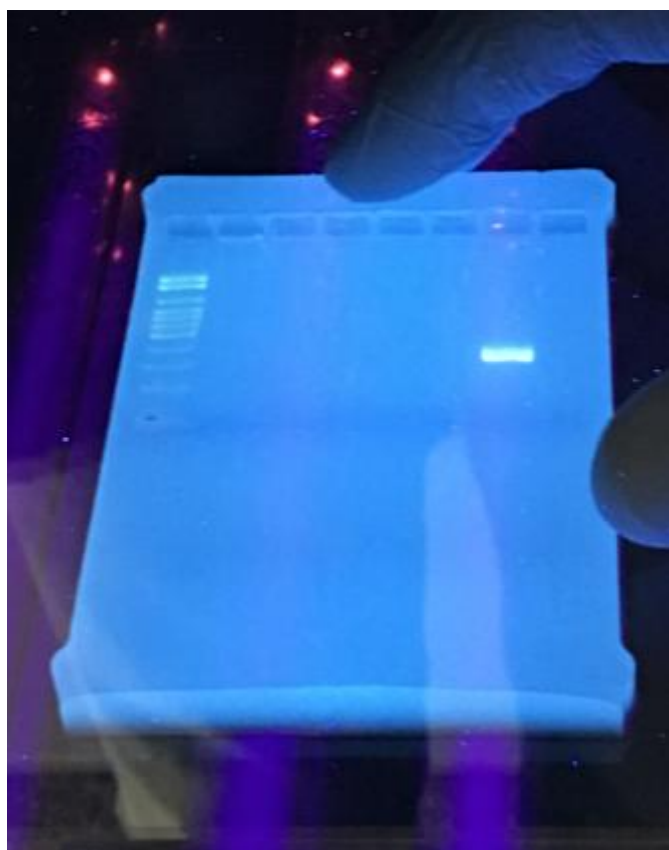


Figura 7. Visualização de controle positivo para *Leptospira interrogans* sorovar Pomona (14A). Botucatu, SP, 2019. Fonte: arquivo pessoal.

4.6.2.5. Controles

Para cada sequência de extração e purificação, foram utilizados controles positivos e negativos para a PCR. Para isto foram preparadas suspensões de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona (14A) na concentração de $2,0 \times 10^4$ leptospiras/mL, como controle positivo. Para o controle negativo foi utilizada água ultrapura.

Análise Estatística

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para calcular o tamanho da amostra foi utilizado o programa Epi Info^{TD} (<http://www.openepi.com>). Nesta versão online do software foi calculado o tamanho amostral utilizando-se o intervalo de confiança de 95% para uma população infinita e baseado em dados de soroprevalência no Estado de São Paulo. O procedimento utilizado para a análise estatística foi baseado na distribuição de frequências das variáveis.

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. Soroaglutinação Microscópica – SAM

Dos 144 animais avaliados, 71/144 (49,3%) foram reagentes à SAM a pelo menos um dos sorovares testados.

Observou-se soropositividade para 12 dos 17 sorovares avaliados, com prevalência para o sorovar Djasiman. Dos 71 animais reagentes, os sorovares mais frequentes foram Djasiman (56,3%), em 40 animais; Hardjoprajitno (40,8%) em 29 animais; HardjoCTG em nove animais (12,7%); Hardjo (11,3%) em oito animais; Hardjobovis (11,3%) em oito animais; Pyrogenes (9,8%) em sete animais; Wolffi (8,4%) em seis animais; Castellonis (7,0%) em cinco animais; Pomona (4,2%) em três animais; Gryppothyphosa (1,4%) em um animal; Hardjomini (1,4%) em um animal; Icterohaemorrhagiae (1,4%) em um animal; e Bratislava (1,4%) em um animal.

Os sorovares não reagentes foram: Canicola, Copenhageni, Guaricura e Tarassovi. O número de animais reagentes à SAM e os respectivos sorovares estão apresentados na figura 8.

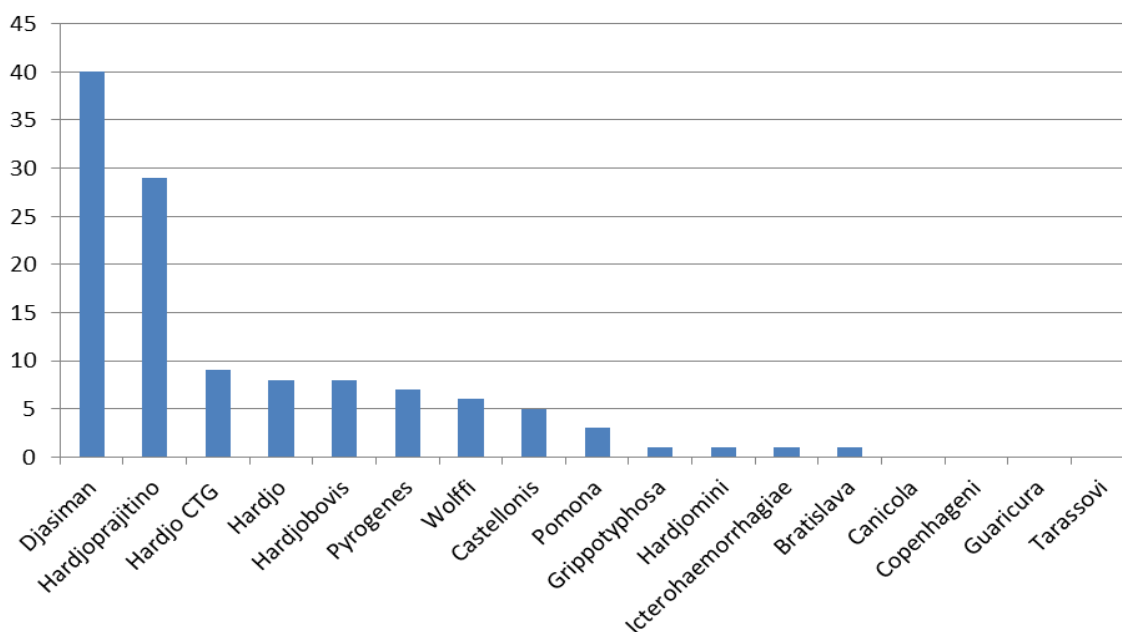


Figura 8. Sorovares reagentes à SAM em 144 bovinos abatidos em frigorífico da região Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.

Quanto aos títulos observados à SAM, 63 (88,7%) animais apresentaram títulos entre 100 e 200; dez (14,1%) animais apresentaram título 400; sete (9,8%) animais apresentaram título 800 e 14 (19,7%) animais título 1600. Não houve resposta para os títulos 3200 e 6400.

Dos 14 animais reagentes com títulos 1600, 11 (78,6%) desses animais responderam ao sorovar Djasiman, sendo que, destes, quatro eram procedentes de Bauru, três animais de Santa Cruz do Rio Pardo; três de Riversul; e um animal procedente de São José do Barreiro.

Os resultados sorológicos podem ser visualizados no quadro 2.

Quadro 2. Soroaglutinação Microscópica (SAM) de 144 bovinos abatidos em frigorífico da região Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.

Animal	Resultado	Sorovar	Titulação
1	R	8A e 15	800 e 100
2	R	15, 8A e 16B	100, 100 e 100
3	R	8 ^a	100
4	R	8 ^a	100
5	R	8A e 15	100 e 100
6	R	8 ^a	100
7	R	8 ^a	100
8	R	15	100
11	R	8A, 16B e PRA	200, 100 e 1600
12	R	8 ^a	100
13	R	8A, 14A, 15 e 16B	800, 800, 400 e 100
14	R	14 ^a	200
16	R	MIN	100
18	R	14 ^a	100
19	R	CTG	200
30	R	15	200
31	R	3 e 8 ^a	400 e 1600
32	R	8A e PRA	1600 e 100
33	R	8A e PRA	800 e 800
34	R	3	100
35	R	8A e PRA	800 e 400

36	R	PRA	1600
37	R	3 e PRA	100 e 100
38	R	8A, 16A e PRA	100, 100 e 100
39	R	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 1600
40	R	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 400
41	R	3, 8A, 16A, PRA e CTG	200, 1600, 100, 200 e 400
42	R	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 100
43	R	8A e 16 ^a	1600 e 200
44	R	8A, PRA e BOV	800, 100 e 100
45	R	8A e PRA	1600 e 400
46	R	8A e PRA	800 e 100
47	R	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 200
48	R	PRA, CTG e BOV	1600, 800 e 200
49	R	8A, PRA e CTG	1600, 100 e 1600
50	R	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 200
52	R	P	200
53	R	8 ^a	100
55	R	8 ^a	100
59	R	PRA e CTG	200 e 100
60	R	8 ^a	100
61	R	BOV	100
62	R	BOV	100
64	R	8 ^a	100
69	R	PRA e BOV	200 e 100
73	R	8A e PRA	100 e 100
75	R	PRA	200
76	R	PRA	400
77	R	CTG	200
84	R	PRA	100
94	R	BOV	100
97	R	CTG	200

109	R	15	100
113	R	8A, 3 e PRA	100, 100 e 200
117	R	9	100
120	R	16B	100
121	R	8 ^a	400
122	R	8A e B	100 e 100
124	R	PRA	100
125	R	16B	100
127	R	8 ^a	400
129	R	8 ^a	200
131	R	11B	100
134	R	8 ^a	400
136	R	8 ^a	200
138	R	16B	100
139	R	8 ^a	100
141	R	8 ^a	100
145	R	CTG, BOV e 1B	100, 100 e 100
146	R	PRA	100
150	R	PRA e CTG	100 e 200

Legenda: NR = não reagente; R = reagente; 8A = Djasiman, 15 = Pyrogenes, 3 = Castellonis, 16A = Hardjo, PRA = Hardjoprjitino; 14A = Pomona, CTG = HardjoCTG; BOV = Hardjobovis, 1B = Bratislava, 9 = Grippytyphosa, 11B = Icterohaemorrhagiae, 16 B = Wolffi, MIN = Hardjomini.

6.2. Reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) para *Leptospira* spp.

6.1.1. Quantificação de DNA

Os resultados de quantificação de DNA obtidos a partir das amostras dos sangue, fígado e rim de 144 bovinos, podem ser visualizados no Apêndice 1.

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

Os iniciadores LEP1 e LEP2 utilizados nas provas moleculares foram descritos por Mérien et al.(1992), os quais amplificam 331 pb.

Os resultados moleculares evidenciaram a presença de DNA de *Leptospira* spp. em rins de 21 animais, em fígado de cinco animais, em fígado e rins em dois animais e em sangue, em um (01) animal.

A visualização dos produtos amplificados à eletroforese a partir de amostras de sangue, fígado e rim pode ser observada nas Figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

A figura 9 ilustra a PCR para *Leptospira* spp. em amostras de sangue. Houve a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. apresentando positividade para a amostra 132.

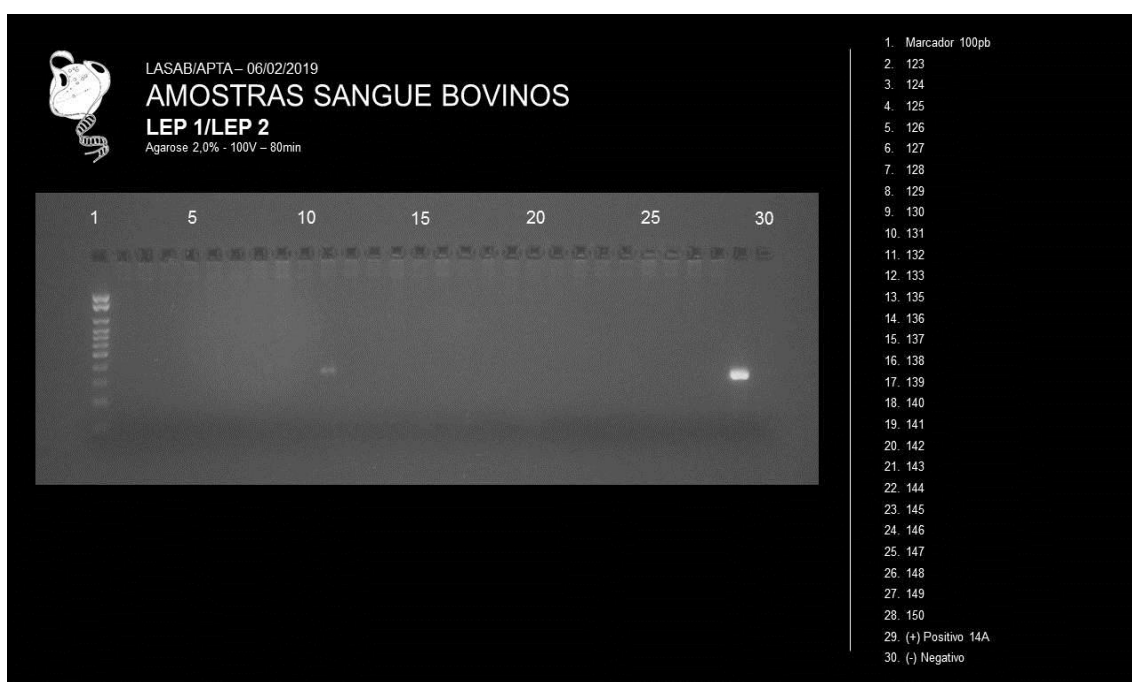


Figura 9. Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de uma amostra de sangue de bovino abatido em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. com positividade para a amostra 132. Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019.

A figura 10 ilustra a PCR para *Leptospira* spp. em amostras de fígado. Houve detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 5, 6 e 10 (correspondentes aos animais 21, 22 e 30, respectivamente).

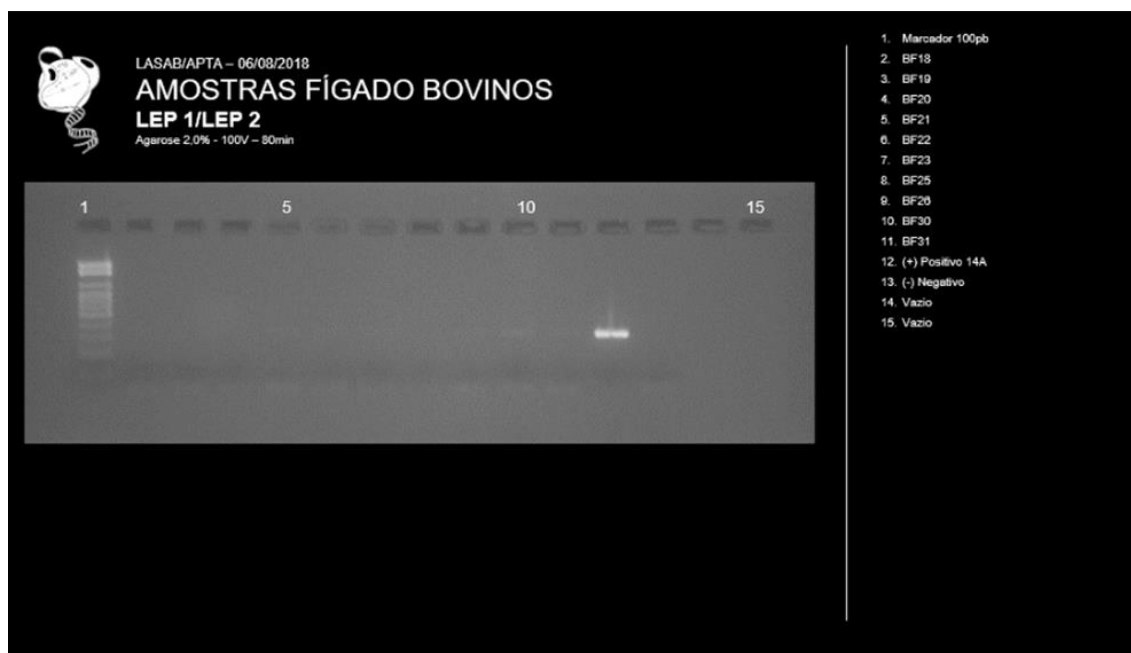


Figura 10. Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de três amostras de fígado de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 5, 6 e 10 (correspondentes aos animais 21, 22 e 30, respectivamente). Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019.

A figura 11 ilustra PCR para *Leptospira* spp. em amostras de fígado. Houve detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 2 e 4 (correspondentes aos animais 22 e 25, respectivamente).

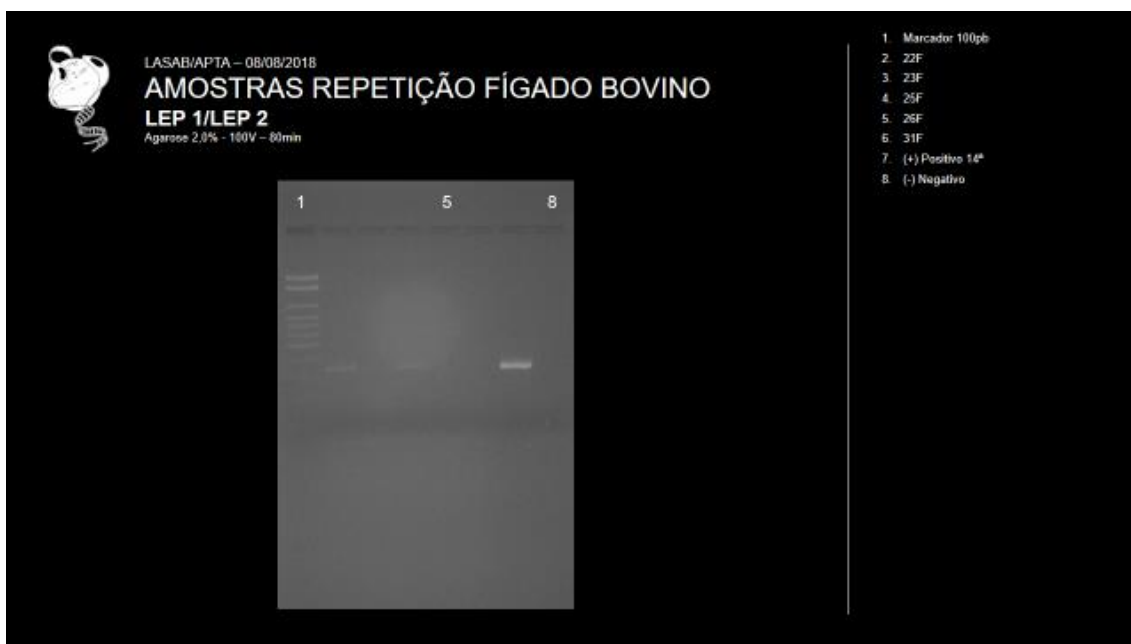


Figura 11. Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de duas amostras de fígado de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 2 e 4 (correspondentes aos animais 22 e 25, respectivamente). Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019.

A figura 12 ilustra PCR para *Leptospira* spp. em amostras de fígado. Houve detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. apresentando positividade para a amostra 39.



Figura 12. Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de amostras de fígado de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. apresentando positividade para a amostra 39. Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019.

A figura 13 ilustra da PCR para *Leptospira* spp. em amostras de rins. Houve detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 2, 6, 7 e 21 (correspondentes aos animais 1, 5, 6 e 22, respectivamente).

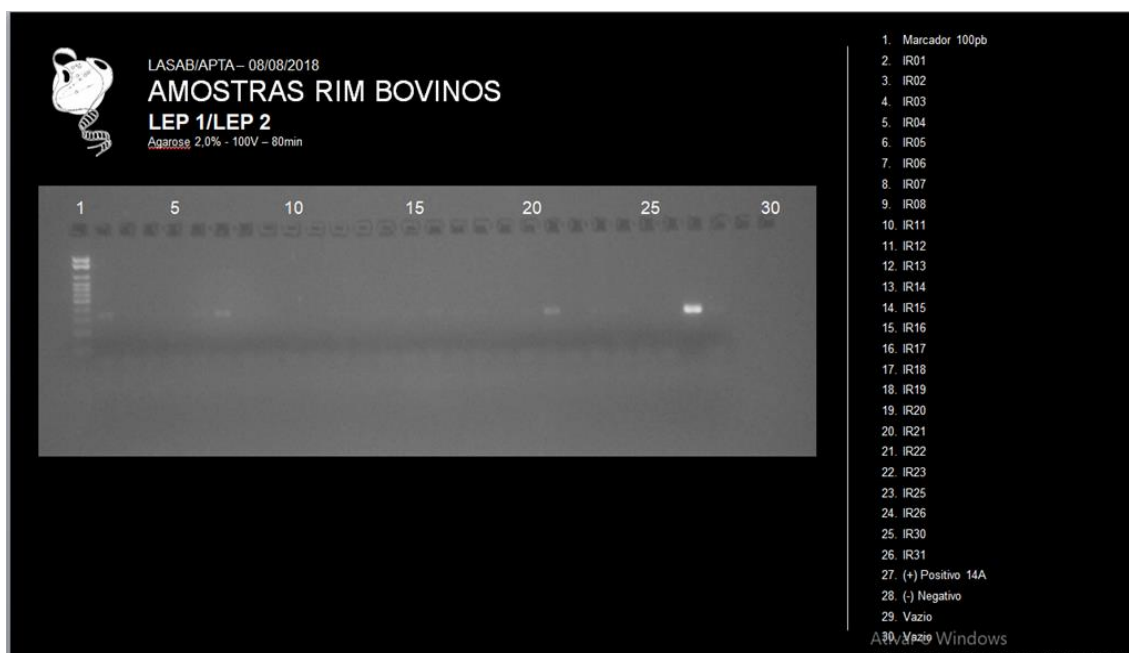


Figura 13. Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de quatro amostras de rim de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. nas amostras 2, 6, 7 e 21 (correspondentes aos animais 1, 5, 6 e 22, respectivamente). Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019.

A figura 14 ilustra PCR para *Leptospira* spp. em amostras de rins. Houve detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. apresentando positividade para as amostras 34, 36, 39, 57, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 92, 93, 94, 98, 102, 104 e 118.

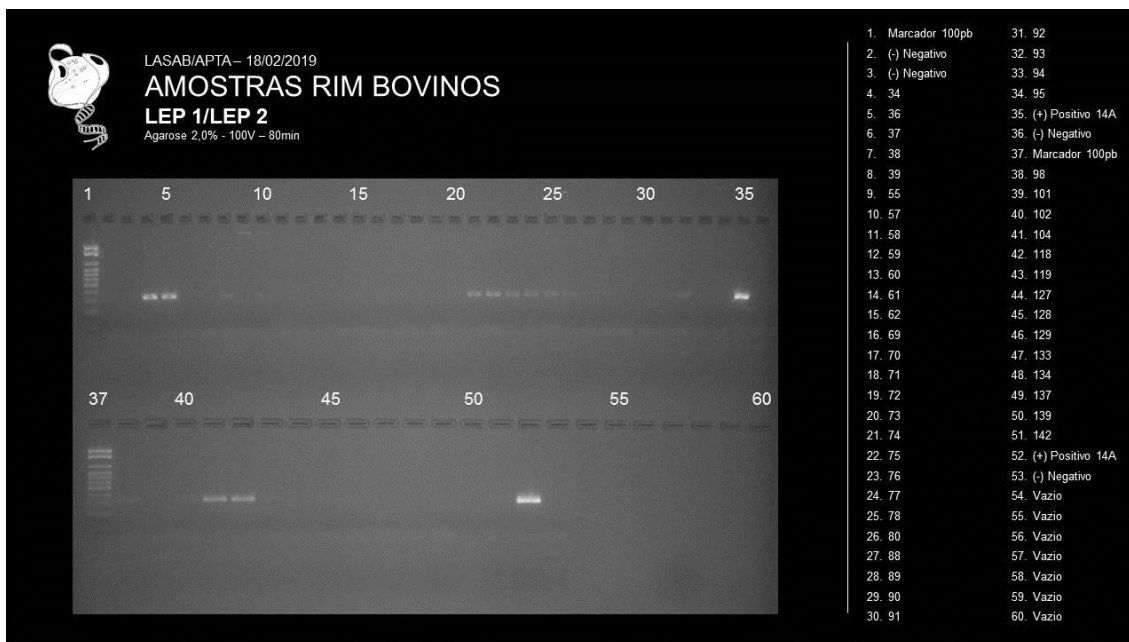


Figura 14. Gel de agarose a 1% corado com Syber® Safe. Amplificação de 17 amostras de rins de bovinos abatidos em frigorífico na região Centro-Oeste paulista. Note-se a detecção do gene codificador do fragmento de 331 pb de *Leptospira* spp. apresentando positividade para as amostras 34, 36, 39, 57, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 92, 93, 94, 98, 102, 104 e 118. Controle positivo: *Leptospira interrogans* sor. Pomona. Controle negativo: água mili Q. Botucatu, SP, 2019

6.3. Resultados - Sorologia e PCR

O quadro 3 demonstra a positividade em relação às provas moleculares para *Leptospira* spp. em 25 dos 144 animais testados (17,4%), a partir da PCR de sangue e tecidos (fígado e rim), bem como os respectivos resultados sorológicos destes animais positivos à PCR.

Quadro 3. Resultados moleculares positivos para *Leptospira* spp. de 25 bovinos abatidos em frigorífico do Centro-Oeste paulista, a partir de amostras de sangue e tecidos (fígado e/ou rim) e respectivos resultados sorológicos pela técnica de SAM. Botucatu, SP, 2019.

A	PROC	S	SANG	FÍG	RINS	SAM
01	Riversul	M	NEG	NEG	POS	8A-800 e 15-100
05	Riversul	M	NEG	NEG	POS	8A-100 e 15-100
06	Itaí	F	NEG	NEG	POS	8A-100
21	Colombia	F	NEG	POS	NEG	NR
22	Colombia	F	NEG	POS	POS	NR
25	Colombia	F	NEG	POS	NEG	NR
30	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	POS	NEG	15-200
34	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	POS	3-100
36	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	POS	PRA-1600
39	São José do Barreiro	M	NEG	POS	POS	8A-1600;16A-100 e PRA-1600
57	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	POS	NR
74	Itaí	F	NEG	NEG	POS	NR
75	Itaí	F	NEG	NEG	POS	PRA-200
76	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	POS	PRA-400
77	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	POS	CTG-200
78	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	POS	NR
80	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	POS	NR
92	Vargem	M	NEG	NEG	POS	NR

93	Vargem	M	NEG	NEG	POS	NR
94	Vargem	M	NEG	NEG	POS	BOV-100
98	Lençóis Paulista	M	NE G	NEG	POS	NR
102	Presidente Alves	F	NEG	NEG	POS	NR
104	Presidente Alves	F	NEG	NEG	POS	NR
118	Presidente Alves	F	NEG	NEG	POS	NR
132	Itaporanga	F	POS	NEG	NEG	NR

A=animal; PROC=procedência; S=sexo; SANG=sangue; FIG=fígado; M=macho; F=fêmea; NEG=negativo; POS=positivo; 8A= Djasiman, 15= Pyrogenes, 3= Castellonis, 16A= Hardjo, PRA= Hardjoprajitino, 14A= Pomona, CTG=HardjoCTG e BOV= Hardjobovis

Discussão

7. DISCUSSÃO

A avaliação do estado sanitário do rebanho de bovinos de corte procedentes de propriedades localizadas no interior paulista e abatidos em frigorífico, em relação ao diagnóstico de leptospirose, é de extrema importância, tendo em vista os possíveis riscos a que os trabalhadores de frigoríficos estão expostos, pela sua atribuição de manipulação de sangue e vísceras, e pelo tempo de exposição e contato prolongado com leptospirosas, caso estejam presentes. Para tanto, procedeu-se a pesquisa molecular de *Leptospira* spp. a partir de amostras de sangue, fígados e rins de bovinos pela técnica de PCR convencional; bem como verificou-se a soroprevalência de *Leptospira* spp. em amostras de sangue destes animais, mediante a SAM.

Pudemos verificar que, dentre o universo amostral de 144 bovinos estudados, 54 (37,5%) não apresentaram título de anticorpos para *Leptospira* spp. e nem DNA detectado em sangue, fígado e/ou rim; porém 71 animais (49,3%) foram sororreagentes e 25 animais (17,4%) apresentaram DNA de *Leptospira* spp, o que pode ser visualizado no Apêndice 1. Tais resultados nos demonstram a necessidade de implementação de manejo zoonosário nas propriedades de procedência destes animais, tendo em vista o risco ocupacional, tanto nas fazendas - contaminação de pastos e fômites e contato com secreções, principalmente urina - quanto no frigorífico, quando da lida destes animais e contato direto com sangue, vísceras e secreções (urina), pelos funcionários, durante a linha de abate.

Ainda, em relação à possibilidade de transmissão da leptospirose nas fazendas, segundo Rajala et al. (2017) a proximidade de animais de produção próximas aos domicílios nas propriedades acentua para o risco de transmissão de zoonoses, dentre elas a leptospirose.

Em relação à titulação nos animais reagentes, a maioria deles apresentaram títulos de 100 e 200, demonstrando a exposição ao agente e a cronicidade da infecção. De acordo com Pinna et al. (2018) animais em estágio crônico da infecção se comportam como reservatórios e fonte de infecção. Os

maiores títulos aglutinantes foram de 1600 para os sorovares Djasiman e Hardjoprajitino.

A alta prevalência do sorovar Djasiman, sorovar frequente em animais silvestres, alerta para o desequilíbrios ambientais, desmatamentos e mais especificamente na região amostrada, a proibição da queimada da cana de açúcar no interior paulista, propiciando uma maior proximidade entre animais de produção e animais silvestres. Langoni *et al.* (2016), avaliando-se pela SAM soros de 55 capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), procedentes dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, verificaram 23 soros reagentes, sendo 13,04% para o sorovar Djasiman. Vieira *et al.* (2016) também observaram que, de um total de 35 animais silvestres procedentes do Pantanal e de quatro diferentes espécies silvestres avaliadas, os sorogrupos prevalentes foram Javanica e Djasiman. É fato que animais silvestres percorrem as propriedades e se aproximam dos animais de produção nos pastos e açudes, os quais podem se infectar com a urina contaminada destes, e vice-versa, pela eliminação de leptospiros na urina por estes animais silvestres, possibilitando a infecção de outros animais contactantes.

Por outro lado, em relação ao sorovar Guaricura, testado nos animais deste estudo, nenhum animal foi reagente, diferente ao observado por Loureiro *et al.* (2016), em que cinco isolados de leptospiros a partir de urina e fluido vaginal de bovinos procedentes do Rio de Janeiro, por sequenciamento verificou-se homologia com sorovar Guaricura.

Os resultados observados quanto à presença de DNA de leptospiros em rins de 21 animais, fígado em cinco, fígado e rim em dois e em sangue em um (01) animal, trazem um alerta para Saúde Pública quanto ao risco ocupacional da leptospirose para os trabalhadores de frigoríficos.

Observou-se um animal positivo à PCR para *Leptospira* spp. em rim, com título sorológico 800 para o sorovar Djasiman. Tal resultado pode demonstrar que no momento da coleta, este animal se encontrava no pico de produção de anticorpos, com tendência à cronicidade da infecção, o que poderia ser verificado caso se realiza-se sorologia pareada, notando-se a queda de produção de anticorpos em um segundo momento.

Verificou-se também dois animais positivos para fígado e rim, sendo um deles reagente para os sorovares Djasiman e Hardjoprajitino, com título 1600, o

que pode significar a mesma situação observada para o sorovar Djasiman. Em outro animal, ainda que detectado o DNA de *Leptospira* spp., se apresentava não reagente, o que pode sinalizar a infecção por outro sorovar não testado neste estudo, ou ainda uma infecção crônica, com leptospiras presentes em fígado e rim.

Por outro lado, um animal apresentou DNA de *Leptospira* spp. em sangue, porém não reagente à sorologia. Isto demonstra que o animal paralelamente encontrava-se na fase aguda da infecção. Desta forma o contato com o sangue deste animal representa um risco para os funcionários do frigorífico, tendo em vista a exposição a que os mesmos se encontram, ainda que utilizem os equipamentos de proteção individual (EPIs). Pôde-se observar que, durante a linha de abate, ocorre o contato direto com o sangue do animal, pois as luvas protegem até uma pequena parte dos braços.

Estudo realizado em indústrias frigoríficas de ovinos da Nova Zelândia comprovou que em cerca de 10000 manipuladores de carcaças, ao redor de 276 podem adquirir a infecção anualmente devido ao trabalho em matadouro, demonstrando risco para Saúde Pública. Esse fato reforça a importância do uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) adequados (DREYFUS *et al.*, 2014). Do mesmo modo Maze *et al.* (2018) comprovaram que 20% dos casos de leptospirose em humanos estão relacionados aos trabalhadores rurais e trabalhadores expostos às fezes, urina e sangue de bovinos.

Cada vez mais há necessidade de se utilizar diagnósticos eficazes e que de maior precisão para o diagnóstico dessa enfermidade. Para a maior precisão do diagnóstico da leptospirose sem dúvida é aquele que evidencie a presença das leptospiras nos tecidos e fluidos corporais. Algumas limitações são evidentes, pois dependem da detecção direta do agente nas amostras colhidas. Nesse caso, o ensaio direto como a PCR é o de eleição. Por outro lado, os testes diagnósticos indiretos com os resultados da detecção de anticorpos pela SAM, são ferramentas úteis para diagnóstico da infecção, como evidenciados no presente estudo.

A pesquisa de leptospiras apresenta limitações na detecção de animais positivos na fase crônica da infecção; portanto a PCR tem sido incentivada como importante ferramenta para o diagnóstico da leptospirose e identificação desses animais (LOUREIRO *et al.*, 2017).

Pela técnica da PCR, pode-se verificar que 25 dos 144 bovinos avaliados (17,4%) apresentaram DNA de *Leptospira* spp., um animal positivo em amostra de sangue, denotando infecção aguda. Em se tratando de bovinos de corte, encaminhados para o abate em frigorífico e tendo-se as amostras sido coletadas no momento da linha de abate, pôde-se verificar o risco ocupacional a que os trabalhadores estão expostos. Ainda que utilizassem os equipamentos de proteção individual (EPIs), pôde-se observar que os mesmos apresentavam alguma parte do corpo em contato direto com as secreções dos animais, como sangue, bem como exposição às vísceras, sendo o fígado e rim bastante manipulados na indústria e, portanto, com risco de infecção durante o trabalho, já que os mesmos permanecem durante muitas horas em contato com estes produtos.

Segundo Pinto (2015), nos testes comparados em seu estudo, a SAM apresentou um aumento significativo da sensibilidade ao redor de 10% quando cepas locais autóctones foram utilizadas como antígenos.

Durante a resposta específica da infecção, como exemplo temos o resultado positivo da PCR da amostra de sangue do animal 132 que apresenta a duração de aproximadamente 10 dias decorrentes do período de instalação da doença, o agente desaparece da corrente sanguínea; já numa segunda fase da doença, o paciente se apresenta em fase de bacteriúria ou leptospirúria que pode durar vários meses e costuma ser intermitente; nesse caso, há maior sensibilidade dos resultados na PCR, podendo-se utilizar de amostras biológicas como urina ou sangue (MÉRIEN *et al.*, 1992).

Para o diagnóstico a partir de amostras de urina, a PCR se mostra ferramenta mais útil e específica sendo o teste mais apropriado para o diagnóstico da leptospirose em animais que se tornam portadores inaparentes e que são disseminadores do agente no meio ambiente, potenciais fontes de infecção (HAMOND *et al.*, 2014).

Os resultados verificados nesta pesquisa revelam animais com características de estágios crônicos da infecção. Os animais de números 22 e 39 apresentaram DNA do agente em fígado e rim, o que demonstra que tais animais se infectaram e eram portadores do agente, com eliminação de leptospiros no ambiente.

Os animais de números 21, 25, 30 e 39 apresentaram DNA de *Leptospira* apenas no fígado, o que demonstra a infecção destes animais pelo agente, sendo importantes fontes de infecção nas indústrias frigoríficas, do mesmo modo que 1 animal, o animal de número 132 com presença de DNA de leptospira no sangue o que indica infecção aguda, expondo trabalhadores da linha de produção ao risco ocupacional desta doença.

Os animais 01, 05, 06, 22, 34, 36, 57, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 92, 93, 94, 98, 102, 104, 118 apresentaram *Leptospira* spp. nos rins, o que os caracterizam como possíveis fontes de infecção e eliminação do agente no meio ambiente, principalmente os animais 01, 36 e 39 por apresentarem títulos mais elevados, 800 e 1660 para o sorovar Djasiman e Hardjoprajtino.

De acordo com Pinna (2018) principalmente em países tropicais e subdesenvolvidos a leptospirose bovina apresenta grande desafio para o controle que impacta negativamente a Saúde Pública, concordamos com essa ponderação avaliando-se os aspectos referentes aos sorovares envolvidos, o meio ambiente que oferece condições de manutenção destes, além da ação humana.

Conclusão

8. CONCLUSÕES

- O estado sanitário dos rebanhos bovinos deste estudo mostrou-se não adequado, tendo em vista a detecção de animais portadores de *Leptospira* spp.;

- A elevada ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. indica exposição ao agente, cronicidade da infecção, e a presença do material genético do agente em sangue e tecidos, aponta para necessidade de implementação de programas de sanidade animal, e para o caráter ocupacional desta zoonose em frigoríficos.

- A complementação dos testes sorológicos e moleculares empregados neste estudo possibilitou diagnóstico mais abrangente e sensível com maior conhecimento de dados epidemiológicos sobre a infecção leptospírica.

Referências

9. REFERÊNCIAS*

AHMAD, S. N.; SHAH, S. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **J. Postgrad. Med.**, Mumbai, v. 51, n. 3, p.195-200, 2005.

BINNS, C.; WAH, Y. L. Leptospirosis: a public health story encircling the globe. **Asia Pacific J. Public Health**, Hong Kong, v. 28, n. 4, p. 288-289, 2016. Editorial.

BOLFARINE, H.; BUSSAB, W. O. **Elementos de amostragem**. São Paulo: Edgar Blücher, 2005. 274 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Manual de leptospirose**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S. S.; GOTTI, T. B.; BATISTA, C. S. A.; GENTILI, J.; MORAES, Z. M.; SOUZA G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 3-11, 2008. Disponível em: <http://producao.usp.br/handle/BDPI/2103>. Acesso em: 3 out. 2016.

COSATE, M. R. V.; SOARES S. C.; MENDES, T. A.; RAITTZ, R. T.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R.; FERNANDES, G. R.; HADDAD, J. P. A.; ORTEGA, J. M. Whole-genome sequence of leptospira interrogans serovar hardjo subtype hardjoprajitno strain norma, isolated from cattle in a leptospirosis outbreak in Brazil. **Genome Announc.**, Washington, v. 3, n. 6, p. e01302-15, 2015. doi: 10.1128/genomeA.01302-15.

DAUD, A. B.; MOHD, F.; WAN, M.; AMRAN, F.; ISMAIL, N. Fatores de leptospirose e de risco no local de trabalho ambiental entre Gado Os

agricultores no Nordeste Malásia. **J. Health Biol. Sci.**, Fortaleza, v. 2, n. 3, p. 99-107, 2018.

OLIVEIRA, P. P. V. ; OHARA, P. M.; JULIANO LEONIDAS HOFFMANN, J. L.; SILVA, L. W. F.; LIMA, A. M. L.; PATRÍCIO, M. I. A.; BARRETO, M. L. C. A.; AVELAR, K. E. S.; CARVALHO, J. L. B.; ARAUJO, W. N. Fatores de risco para leptospirose, relacionados à atividade laboral em agricultores de arroz em uma cidade do nordeste do Brasil. **J. Health Biol. Sci.**, Fortaleza, v. 2, n. 3, p. 99-107, 2018.

DREYFUS, A.; WILSON, P.; COLLINS-EMERSON, J.; BENSCHOP, J.; MOORE, S.; HEUER, C. Risk factors for new infection with *Leptospira* in meat workers in New Zealand. **Occup. Environ. Med.**, London, v. 72, n. 3, p. 219-225, 2015. doi: 10.1136/oemed-2014-102457. Epub 2014 Dec 17.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982. (WHO Offset Publication, 67).

FOUTS, D. E.; MATTHIAS, M. A.; ADHIKARLA, H.; ADLER, B.; AMORIM-SANTOS, L.; BERG, D. E.; BULACH, D.; BUSCHIAZZO, A.; CHANG, Y. F.; GALLOWAY, R. L.; HAAKE, D. A.; HAFT, D. H.; HARTSKEERL, R.; KO, A. I.; LEVETT, P. N.; MATSUNAGA, J.; MECHALY, A. E.; MONK, J. M.; NASCIMENTO, A. L.; NELSON, K. E.; PALSSON, B.; PEACOCK, S. J.; PICARDEAU, M.; RICALDI, J. N.; THAIPANDUNGPANIT, J.; WUNDER JUNIOR, E. A.; YANG, X. F.; ZHANG, J. J.; VINETZ, J. M. What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. e0004403, 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0004403.

GARCIA, L. E.; MELO, L. M.; BRAGATO, J. P.; PEIRÓ, J. R.; FÉLIX, V. M.; MARINHO, M.; ARNOLD, D. R.; LOPES, F. L. Characterization of the microtranscriptome of macrophages infected with virulent, attenuated and

saprophyte strains of *Leptospira* spp. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 12, n. 7, p. e0006621. 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006621.

GUEDES, I. B.; ARAUJO, S. A.; SOUZA, G. O.; SILVA, S. O.; TANIWAKI, S. A.; CORTEZ, A.; BRANDAO, P. E.; HEINEMANN, M. B. Circulating *Leptospira* species identified in cattle of the Brazilian Amazon. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 191, p. 212-216, 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.01.011.

GUERNIER, V.; GOARANT, C.; BENSCHOP, J.; LAU, C. L. A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0006503, 2018.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A.P.; PESTANA, C.; LAWSON-FERREIRA, R.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUMAM, W. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. **Vet. Res. Commun.**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 81-85, 2014.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W.; PINNA, M.; MEDEIROS, M. A. Infection by *Leptospira* spp. in cattle in a tropical region, Rio de Janeiro, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Mclean, v. 92, n. 1, p. 210, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE**: estatística da produção pecuária. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201601_publ_completa.pdf. Acesso em: 14 set. 2016.

JANWITTHAYANAN, W.; KEELAWAT, S.; PAYUNGORN, S.; LOWANITCHAPAT, A.; SUWANCHAROEN, D.; POOVORAWAN, Y.; CHIRATHAWORN, C. In vivo gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase. **Microbiol. Res.**, Jena, v. 168, n. 5, p. 268-272, 2012.

JOHNSON, R. C.; ROGERS, F. C. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire with 8-azaguanine. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 88, p. 618–1623, 1964.

LANGONI, H.; KURIBARA, I. Y.; CORREA, A. P. F. L.; ULLMANN, L. S.; SANCHEZ, G. P.; LUCHEIS, S. B. Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, Botucatu, v. 27, n. 22, p. 4, 2016. doi: 10.1186/s40409-016-0059-6. eCollection 2016.

LILENBAUM, W.; MARTINS, G. Leptospirosis in cattle: a challenge scenario for the understanding of the epidemiology. **Transbound. Emerg. Dis.**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 63-68, 2014.

LEVETT, P. N.; SMYTHE, L. International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 64, p. 1071-1072, 2014.

LOUREIRO, A.P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospire from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro – Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Res. Vet. Sci.** 2016, doi: 10.1016/j.rvsc.2016.02.012.

LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 178, p. 50-54, 2017. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.01.008.

MAZE, M. J.; CASH-GOLDWASSER, S.; RUBACH, M. P.; BIGGS, H. M.; GALLOWAY, R. L.; SHARPLES, K. J.; ALLAN, K. J.; HALLIDAY, J. E. B.; CLEVELAND, S.; SHAND, M. C.; MUIRURI, C.; KAZWALA, R. R.; SAGANDA, W.; LWEZAULA, B. F.; MMBAGA, B. T.; MARO, V. P.; CRUMP, J. A.. Risk factors for human acute leptospirosis in northern Tanzania. Jun, 2018.

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

NILOOFA, R.; FERNANDO, N.; DE SILVA, N. L.; KARUNANAYAKE, L.; WICKRAMASINGHE, H.; DIKMADUGODA, N.; PREMAWANSA, G.; WICKRAMASINGHE, R.; DE SILVA, H. J.; PREMAWANSA, S.; RAJAPAKSE, S.; HANDUNNETTI, S. Diagnosis of Leptospirosis: Comparison between Microscopic Agglutination Test, IgM-ELISA and IgM Rapid Immunochromatography Test. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0129236, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0129236. eCollection 2015.

OLIVEIRA, P.; A, SOARES, L.; BORGES, J.; BARROSA, N.; LANGONI, H.; BRANDESPIM, C.; JUNIOR, J. W. P.; MOTA, R. Occurrence of serological reactions for serogroup Sejroe (CTG and Prajтино) in female buffalo in the state of Pernambuco, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 795–800, 2018. doi: 10.1016/j.bjm.2018.02.00749(4):795-800.

PASSOS, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; YASUDA, P. H.; NÜRMBERGER JUNIOR, R. Isolamento de leptospiros a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. Emprego das técnicas da pipeta Pasteur e das diluições seriadas em meio de Fletcher tratado com o 5-Fluor-Uracil ou sulfato de neomicina. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, v. 25, n. 2, p. 221-235, 1988.

PINNA, M. H.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; Walter LILENBAUM, W.. Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. 5 January 2018.

PINTO, P. S.; LOUREIRO, A. P.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 149, p.163-167, 2015. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.05.008. Epub 2015 May 19.

RAJALA, E. L.; , NOSIRJON SATTOROV, N.; BOQVIST, S.; MAGNUSSON, U. Bovine leptospirosis in urban and peri-urban dairy farming in low-income countries: a “One Health” issue? **Acta Vet Scand.**, Epub 2017.

RAO, R. S.; GUPTA, N.; BHALLA, P.; AGARWAL, S. K. Leptospirosis in India and the rest of the world. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 7, n. 3, p. 178-193, 2003.

STODDARDA, R. A.; GEE, J. E.; WILKINSA, P. P.; MCCAUSTLANDB, K.; HOFFMASTERA, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014. Epub 2009 Apr 22.

SILVEIRA, M. C. A. **Procedimentos em técnicas laboratoriais vegetais.** 2010. 94 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2010.

TORRES-CASTRO, M.; HERNÁNDEZ-BETANCOURT, S.; AGUDELO-FLÓREZ, P.; ARROYAVE-SIERRA, E.; ZAVALA-CASTRO, J.; PUERTO, F. I. Current review of the epidemiology of leptospirosis. **Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.**, México, v. 54, n. 5, p. 620-625, 2016.

VIEIRA, A. S.; NARDUCHE, L.; MARTINS, G.; SCHABIB-PERES, I. A.; ZIMMERMANN, N. P.; JULIANO, R. S.; PELLEGRIN, A. O.; LILENBAUM, W. Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 163, n. 87, p. 9, 2016.

ZARANTONELLI, L.; SUANES, A.; MENY, P.; BURONI, F.; NIEVES, C.; SALABERRY, X.; BRIANO, C.; ASHFIELD, N.; DA SILVA SILVEIRA, C.; DUTRA, F.; EASTON, C.; FRAGA, M.; GIANNITTI, F.; HAMOND, C.; MACÍAS-RIOSECO, M.; MENÉNDEZ, C.; MORTOLA, A.; PICARDEAU, M.; QUINTERO, J.; RÍOS, C.; RODRÍGUEZ, V.; ROMERO, A.; VARELA, G.; RIVERO, R.; SCHELOTTO, F.; RIET-CORREA, F.; BUSCHIAZZO, A.; GRUPO DE

TRABAJO INTERINSTITUCIONAL DE LEPTOSPIROSIS CONSORTIUM. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. e0006694, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006694. eCollection 2018 Sep. 2018.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

Anexos

Documento entregue ao CEUA - Comitê de Ética Animal



ATESTADO

Atesto que o Projeto "AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA IEPTOSPIRA SPP. EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO." **Protocolo CEUA 0063/2017**, a ser conduzido por Marcelo Augusto Orsi Dutra, responsável/orientador Simone Baldini Lucheis, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	17/04/2017 a 31/10/2017
Nome Comum / Espécie / Linhagem	BOVINA / BOS INDICUS / vários
Raça	Vários
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	150
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	322
Idade	3 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Frigorífico de abate de Bovinos

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 13/04/2017

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

**Protocolo de extração de DNA - kit IllustraBlood™genomicPrep Mini Spin
(GE Healthcare^R)**

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

**Protocolo de extração de DNA - kit IllustraTissue™genomicPrep Mini Spin
(GE Healthcare^R)**

1. O tecido já preparado em microtubo deverá ser centrifugado a 16000rcf por 2 min.
2. Descartar o sobrenadante e adicionar 50 uL de PBS 7,2.
3. Agitar por 10 seg. no agitador (vortex).
4. Adicionar 50 uL da solução Lise 1.
5. Adicionar 10 uL da solução proteinase K e agitar por 15 seg.
6. Incubar em banho-maria por 60 min. a 56 °C.
7. Após esse período centrifugar a 2000rcf por 10 seg.
8. Adicionar 500 uL de Lysis Buffer Type 4 e agitar por 15 seg.
9. Incubar o microtubo na temperatura ambiente por 10 min.
10. Paralelamente, montar uma minicoluna dentro de um tubo coletor.
11. Transfira o conteúdo do microtubo dentro da minicoluna.
12. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 rcf.
13. Remover o tubo coletor para descartar o conteúdo e montar a minicoluna no mesmo tubo coletor.
14. Adicionar 500 uL de Lysis Buffer Type 4 à coluna.
15. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 rcf.
16. Descartar o conteúdo do tubo coletor e montar a minicoluna novamente nele.
17. Adicionar 500 uL de Wash Buffer Type 6.
18. Centrifugar por três minutos a 11000rcf e descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo livre de DNase.
19. Adicionar 50 uL do buffer de eluição, preaquecido a 70 °C.
20. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
21. Centrifugar por 1 minuto a 11000 rcf.
22. Descartar a coluna e armazenar o microtubo em freezer a -20 °C.

Appendice

Apêndice 1. Resultados gerais das técnicas diagnósticas de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leptospiraspp.* a partir de sangue, fígado e rim de 144 bovinos abatidos em frigorífico do Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.

A	PROCEDÊNCIA	S	PCR			SAM	
			SANG	FÍG	RIM	Sorovar	Titulação
01	Riversul	M	NEG	NEG	POS	8A e 15	800 e 100
02	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	15, 8A e 16B	100, 100 e 100
03	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	8A	100
04	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	8A	100
05	Riversul	M	NEG	NEG	POS	8A e 15	100 e 100
06	Itaí	F	NEG	NEG	POS	8A	100
07	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	8A	100
08	Sabino	F	NEG	NEG	NEG	15	100
11	Avaí	M	NEG	NEG	NEG	8A, 16B e PRA	200, 100 e 1600
12	Avaí	M	NEG	NEG	NEG	8A	100
13	Presidente Alves	M	NEG	NEG	NEG	8A, 14A, 15 e 16B	800, 800, 400 e 100
14	Presidente Alves	M	NEG	NEG	NEG	14A	200
15	Presidente Alves	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
16	Avaí	M	NEG	NEG	NEG	MIN	100
17	Avaí	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
18	Avaí	M	NEG	NEG	NEG	14A	100
19	Avaí	M	NEG	NEG	NEG	CTG	200
20	Avaí	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
21	Colombia	F	NEG	POS	NEG	NR	NR
22	Colombia	F	NEG	POS	POS	NR	NR
23	Colombia	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
25	Colombia	F	NEG	POS	NEG	NR	NR
26	Colombia	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
30	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	POS	NEG	15	200
31	Sta Cruz Rio	F	NEG	NEG	NEG	3 e 8A	400 e 1600

	Pardo						
32	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	8A e PRA	1600 e 100
33	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	8A e PRA	800 e 800
34	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	POS	3	100
35	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	8A e PRA	800 e 400
36	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	POS	PRA	1600
37	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	3 e PRA	100 e 100
38	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	8A, 16A e PRA	100, 100 e 100
39	São José do Barreiro	M	NEG	POS	POS	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 1600
40	Sta Cruz Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 400
41	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	3, 8A, 16A, PRA e CTG	200, 1600, 100, 200 e 400
42	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 100
43	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	8A e 16A	1600 e 200
44	Bauru	M	NEG	NEG	NEG	8A, PRA e BOV	800, 100 e 100
45	Bauru	M	NEG	NEG	NEG	8A e PRA	1600 e 400
46	Bauru	M	NEG	NEG	NEG	8A e PRA	800 e 100
47	Bauru	M	NEG	NEG	NEG	8A, 16A e PRA	1600, 1000 e 200
48	Bauru	M	NEG	NEG	NEG	PRA, CTG e BOV	1600, 800 e 200
49	Bauru	M	NEG	NEG	NEG	8A, PRA e CTG	1600, 100 e 1600
50	Bauru	M	NEG	NEG	NEG	8A, 16A e PRA	1600, 100 e 200

51	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
52	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	PRA	200
53	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	8A	100
54	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
55	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	8A	100
56	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
57	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	POS	NR	NR
58	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
59	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	PRA e CTG	200 e 100
60	Santa Cruz do Rio Pardo	F	NEG	NEG	NEG	8A	100
61	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	BOV	100
62	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	BOV	100
63	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
64	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	8A	100
65	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
66	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
67	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
68	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
69	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	PRA e BOV	200 e 100
70	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
71	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
72	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
73	Itaí	F	NEG	NEG	NEG	8A e PRA	100 e 100

74	Itaí	F	NEG	NEG	POS	NR	NR
75	Itaí	F	NEG	NEG	POS	PRA	200
76	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	POS	PRA	400
77	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	POS	CTG	200
78	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	POS	NR	NR
79	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
80	Lençóis Paulista	F	NEG	NEG	POS	NR	NR
81	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
82	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
83	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
84	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	PRA	100
85	Riversul	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
86	Vargem	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
87	Vargem	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
88	Vargem	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
89	Vargem	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
90	Vargem	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
91	Vargem	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
92	Vargem	M	NEG	NEG	POS	NR	NR
93	Vargem	M	NEG	NEG	POS	NR	NR
94	Vargem	M	NEG	NEG	POS	BOV	100
95	Vargem	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
96	Lençóis Paulista	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
97	Lençóis Paulista	M	NEG	NEG	NEG	CTG	200
98	Lençóis Paulista	M	NEG	NEG	POS	NR	NR
99	Lençóis Paulista	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
100	Lençóis Paulista	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
101	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR

102	Presidente Alves	F	NEG	NEG	POS	NR	NR
103	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
104	Presidente Alves	F	NEG	NEG	POS	NR	NR
105	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
106	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
107	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
108	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
109	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	15	100
110	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
111	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
112	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
113	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	8A, 3 e PRA	100, 100 e 200
114	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
115	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
116	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
117	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	9	100
118	Presidente Alves	F	NEG	NEG	POS	NR	NR
119	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
120	Presidente Alves	F	NEG	NEG	NEG	16B	100
121	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	8A	400
122	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	8A e B	100 e 100

123	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
124	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	PRA	100
125	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	16B	100
126	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
127	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	8A	400
128	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
129	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	8A	200
130	Riversul	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
131	Itaporanga	F	NEG	NEG	NEG	11B	100
132	Itaporanga	F	POS	NEG	NEG	NR	NR
133	Itaporanga	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
134	Itaporanga	F	NEG	NEG	NEG	8A	400
135	Itaporanga	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
136	Itaporanga	F	NEG	NEG	NEG	8A	200
137	Itaporanga	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
138	Avaré	M	NEG	NEG	NEG	16B	100
139	Avaré	M	NEG	NEG	NEG	8A	100
140	Avaré	M	NEG	NEG	NEG	NR	NR
141	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	8A	100
142	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
143	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
144	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
145	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	CTG, BOV e 1B	100, 100 e 100
146	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	PRA	100
147	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
148	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
149	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	NR	NR
150	Bariri	F	NEG	NEG	NEG	PRA e CTG	100 e 200

A=animal; S=sexo; SANG=sangue; FIG=fígado; M=macho; F=fêmea; NEG=negativo; POS=positivo; NR=não reagente; 8a =Djasiman, 15= Pyrogenes, 3=Castellonis, 16A=Hardjo, PRA =Hardjoprjaitino, 14A = Pomona, CTG = HardjoCTG e BOV = Hardjobovis. OBS: Houve perda das amostras biológicas dos animais: 9,10, 24, 27, 28 e 29 na linha de abate.

Apêndice 2. Quantificação do DNA das amostras de sangue de bovinos coletada em frigorífico do Centro-Oeste paulista. Botucatu - SP, 2019.

Amostra	Relação $^{260}/_{280}$	DNA amostra (ng/μl)
BS 132	1,965	56,0

Quantificação do DNA das amostras de fígado de bovinos coletados em frigorífico do Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.

Amostra	Relação $^{260}/_{280}$	DNA amostra (ng/μl)
IF21	1,846	-24,0
IF22	1,154	52,5
IF25	-0,606	-3,0
IF30	1,424	60,5
IF39	1,177	8,3

Quantificação do DNA das amostras de rim de bovinos coletados em frigorífico do Centro-Oeste paulista. Botucatu, SP, 2019.

Amostra	Relação $^{260}/_{280}$	DNA amostra (ng/μl)
IR01	1,597	9,9
IR05	1,698	5,4
IR06	1,122	6,5
IR22	1,427	7,3
IR34	1,874	16,4
IR36	1,699	9,6
IR39	1,240	46,5
IR57	1,931	22,5
IR74	2,091	19,0
IR75	2,177	27,0
IR76	2,603	15,8
IR77	2,941	20,0
IR78	2,217	24,5

IR80	2,381	20,0
IR92	1,542	13,8
IR93	1,380	9,8
IR94	1,683	17,0
IR98	1,713	18,5
IR102	1,761	28,0
IR104	1,950	20,0
IR118	2,713	17,5
