ANNA MARIA CASAGRANDE SARMENTO

Emprego de estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros

São Paulo

2009

ANNA MARIA CASAGRANDE SARMENTO

Emprego de estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2231
FMVZ

Sarmento, Anna Maria Casagrande
Emprego de estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros / Anna Maria Casagrande Sarmento. -- 2009.
136 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos.

1. Leptospirose. 2. Bovinos (fêmeas). 3. Diagnóstico. 4. Soroaglutinação microscópica. 5. Estirpes autóctones. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Emprego de estirpes de leptospiras autóctones isoladas no Brasil na prova de soroaglutinação microcópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose bovina", protocolado sob o nº1288/2008, utilizando 9939 (nove mil novecentas e trinta) amostras de soro bovino, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research "Use of leptospira strains isolated in Brazil as antigens in the microscopic agglutination test applied to diagnosis of leptospirosis in bovines", protocol number 1288/2008, under the responsibility Prof. Dr. Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP
SP, ___/___/___

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SARMENTO, Anna Maria Casagrande

Título: Emprego de estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/ _____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, por seguir o meu caminho nesta vida e poder deixar gravado nas linhas da minha alma, o amor, a dedicação e compaixão pelos animais e pelas pessoas que me cercam.

Oração de São Francisco (Protetor dos animais)

Senhor,

Fazei-me instrumento de vossa paz!

Onde houver ódio, que leve o amor.

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.

Onde houver discórdia, que eu leve a união.

Onde houver dúvida, que eu leve a fé.

Onde houver erro, que eu leve a verdade.

Onde houver desespero, que eu leve a esperança.

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó, mestre

Fazei que eu procure mais.

Consolar, que ser consolado.

Compreender, que ser compreendido.

Amar, que ser amado.

Pois é dando, que se recebe.

É perdoando, que se é perdoado.

e é morrendo, que se vive para a vida eterna!

Dedico,

A meus pais Anna Maria e Nelson,

“Vocês são um presente de Deus para mim, valendo-me das palavras de Nossa Senhora, eu digo do mais profundo do meu coração: "A minha alma engrandece ao Senhor e o meu espírito exulta em Deus, meu salvador", porque me agraciou com pais maravilhosos como vocês”.

Ao meu esposo e ao meu filho

Marcelo e João Marcelo,

“Eu fico com a pureza da resposta das crianças, é a vida! é bonita, e é bonita! viver e não ter a vergonha de ser feliz, cantar e cantar e cantar, a beleza de ser um eterno aprendiz.

Minha vida ontem e hoje, minhas vidas hoje e amanhã!

“.....Eu tenho tanto para lhes falar, mas com palavras não sei dizer como é grande o meu amor por ”..... vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, professor doutor **Silvio Arruda Vasconcellos,** que além de ser o mentor deste trabalho, é exemplo de um grande docente e profissional, agradeço a dedicação, paciência, carinho e amizade de um verdadeiro pai, que aconselhou e ajudou nos momentos mais difíceis, no desenvolvimento deste trabalho e na vida pessoal.

Á professora doutora, **Sônia Regina Pinheiro**, minha iniciadora deste desencanto, abriu meus olhos, me guiou para uma luz com muito brilho, mostrou os caminhos, talvez longos, mas corretos e onde pude crescer profissionalmente. “Amigo é coisa para se guardar debaixo de sete chaves, dentro do coração, assim falava a canção.” Sem você, eu não estaria aqui e este trabalho não existiria. Obrigada por tudo, você é uma pessoa muito especial, uma verdadeira amiga.

Às técnicas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, **Zenáide Maria de Morais Higa**, uma verdadeira mãe, que afaga, dá aconchego, calor e carinho e a **Gisele Oliveira de Souza**, obrigada pelo seu entusiasmo, uma pessoa muito carismática. Obrigada por todo apoio técnico e pessoal.

Em especial, a técnica do Laboratório de Epidemiologia e Estatística do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, **Jucélia de Jesus Pereira,** um coração grande que irradia tanta luz e amor, que quase não cabe dentro do seu peito. Obrigada pela força pessoal e técnica na preparação dos mapas e gráficos, na orientação final desta dissertação.

Ao professor doutor, **Sérgio Santos Azevedo**, da Universidade Federal de Campina Grande (PB), pela ajuda na estatística desta dissertação, pela amizade e acolhimento em sua própria casa e em especial a sua esposa **Carolina de Sousa Américo Batista,** uma verdadeira amiga, que acolhe e recebe os amigos com muito carinho e atenção,...por isso se for preciso conte comigo, amigos disponha....lembre-se que mesmo modesta, minha casa será sempre sua....”

A todos os **docentes** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), com especial atenção aos docentes: **Paulo Eduardo Brandão** e **Rodrigo Martins Soares** pela ajuda em Biologia Molecular; **Marcelo Bahia Labruna, Solange Maria Gennari** e a **Hilda Fátima de Jesus Pena**, pela oportunidade de ser aluna do PAE (Programa de Aperfeiçoamento de Ensino); **Fumio Homna Ito** pelo abstract. Fico muito grata! A **Evelise Oliveira Telles** e a **Simone de Carvalho Balian** que abriram o caminho neste Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Ao professor Dr. **Júlio César de Freitas** e a **Ádina Cléia Botazzo Delbem, da Universidade Estadual de Londrina, Paraná,** pelo fornecimento de estirpes de leptospiras isoladas de animais em Londrina, Paraná.

Ao professor Dr. **Odir Ântonio Dellagostin** e a **Fabiana Kömmling Seixas**, da Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, pelas provas de VNTR.

Um obrigado especial, ao **Gustavo Maia de Cerqueira, pós-doutor do Instituto Butantâ,** pela ajuda na correção e indicação das referências de Biologia Molecular em leptospirose.

Obrigada a **Fabiana Miraglia** e **Rosângela Claret de Oliveira**, colegas de pós-graduação pela concessão dos dados das estirpes isoladas.

Obrigada a todos os **funcionários do VPS**, pela amizade e companheirismo.

Agradeço a oportunidade de conhecer o Laboratório de Investigação Médica (LIM) em Reumatologia da Faculdade de Medicina, USP, São Paulo do professor doutor **Natalino Hagime Yoshinari**, que desenvolve pesquisa com borreliose, agradeço em especial a técnica deste laboratório, **Virginia**, e a pós-graduanda, **Mariana Spolidorio**.

A todos os **estagiários** do Laboratório de Zoonoses Bacterianas que ajudaram neste trabalho.

Aos meus colegas **pós-graduandos** em especial a **Adriana, Iara** e **Isabelle**, companheiras de ombro amigo, onde pudemos partilhar as magoas e as alegrias. Aos meus colegas de leptospirose e de laboratório, a **Flávia Carolina de Oliveira**, obrigada pela esta energia forte e irradiante de uma verdadeira baiana e amiga, obrigada pela ajuda nesta dissertação, com saúde, muito amor e paz, vivamos felizes, cada instante de nossas vidas. A **Amane Paldes Gonçales**, obrigada pela ajuda na parte prática deste trabalho e pela experiência passada em laboratório, ao **Giancarlo**, **Cristina**, **Ricardo**, **Carlos Augusto**, **Pilar**, **Will**, **Flávia**, **Vivianne** e em especial ao **André** e **Miguel**, obrigada pelos momentos agradáveis e de descontração.

Agradeço de todo meu coração, sem conhecê-los, mas sem vocês este trabalho não existiria, a todos veterinários e meus caros colegas que representam a empresa Pfizer, **Ulisses Ribeiro**, **Alécio Costa, Rafael do Amaral Martins**, **Alcidez Cabral de Menezes Junior**, **José Estenio Batista Adegas**, **Marcos Alberto Vieira**, **André Vinhas**, **Luiz Augusto Ismael Sapede**, **Enoch**, **Adriano Hugues de Souza**, **Delamar Macedo**, **Adauto T. Sakashita**, **João Carlos F. Dassie**, **Marcelo Costa**, **Claudemar Gameiro**, **Luciana Sekito de Freitas**, **Dalton Cevolo**, **Carlos Sérgio Marques**, **Gismério Clemente Vilella**, **Lupércio de Antonio Junior** em especial **ao Oclydes Bartarini Júnior e Fernanda Hoe**, coordenadores da seção de animais de grande porte desta renomada empresa.

A toda equipe da biblioteca da FMVZ – USP, **Elza** agradeço pela correção da dissertação e pela sua receptividade carinhosa, agradecimento especial a **Solange** que me acompanhou nesta caminhada da pesquisa na biblioteca, sempre atenciosa e prestativa e a **Fernanda** e **Rosangela**. Obrigada.

As funcionárias da pós-graduação da FMVZ - USP, especialmente **Cláudia, Joana, Dayse e Carlos**

À Capes- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

“CHEGARÁ O DIA EM QUE OS HOMENS
CONHECERÃO O ÍNTIMO DOS ANIMAIS,
NESSE DIA, UM CRIME COMETIDO
CONTRA UM ANIMAL, SERÁ CONSIDERADO
UM CRIME CONTRA A HUMANIDADE.

Leonardo da Vinci

RESUMO

RESUMO

SARMENTO, A. M. C. **Emprego de estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros.** [Use of strains of leptospires isolated in Brazil, for the microscopic agglutination test applied to the diagnosis of leptospirosis in bovine herds of eight Brazilian states]. 2009.134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A leptospirose bovina é uma das principais doenças reprodutivas que interfere diretamente nos índices de produção e produtividade da pecuária brasileira e mundial e por isso necessita de um aprimoramento do diagnóstico laboratorial. O objetivo do presente trabalho foi investigar a conveniência do emprego de estirpes de leptospiras autóctones isoladas no Brasil, na coleção de antígenos da microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM) aplicada a leptospirose. A coleção de antígenos de referência foi constituída pelos sorovares: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Patoc e Sentot. As dez estirpes isoladas no Brasil incluíram os sorovares: Bananal (duas estirpes), Brasiliensis, Canicola (três estirpes), Copenhageni, Guaricura e Pomona (duas estirpes). Foram amostradas por conveniência, 109 propriedades e 9820 bovinos, fêmeas em idade de procriar, distribuídos em 84 municípios, dos Estados de: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Dos 9820 animais examinados, 5806 (59,12%) foram reagentes na SAM para qualquer sorovar com a coleção de 23 sorovares de referência. Com a coleção de antígenos de referência e dez estirpes autóctones houve 6400 (65,17%) reagentes, a diferença observada foi significante (p= 0,001). O único Estado em que não houve diferença significante no número de animais reatores para qualquer sorovar foi o de Santa Catarina (p=0,522). Das 109 propriedades trabalhadas, 106 foram consideradas positivas com pelo menos um animal reagente na SAM. Não houve diferença no número de propriedades positivas segundo a coleção de antígenos empregada. Os sorovares mais prováveis identificados com a coleção de antígenos de referência foram Hardjo (43,03 %),

Shermani (20 %), Wolffi (9,96%), Grippothyphosa (5,42%) e Pomona (4,28%). Com a coleção ampliada por dez estirpes isoladas no Brasil, os sorovares mais prováveis foram Hardjo (31,00%), Guaricura - M4/84 (22,50%), Shermani (15,43%), Wolffi (4,76%), Grippothyphosa (3,71%) e Autumnalis (3,24%). O sorovar Guaricura, estirpe M4/84, isolada de bovinos e búfalos no Estado de São Paulo, foi o primeiro colocado como sorovar mais provável no Estado de Mato Grosso, diferença significante do valor obtido para o sorovar Hardjo (*p*= 0,0001). No Mato Grosso do Sul a despeito do valor absoluto ter sido superior para o sorovar Guaricura, a diferença observada com o sorovar Hardjo foi destituída de significado estatístico (*p*=.0,753). Em São Paulo o Guraricura foi o segundo colocado e em Minas Gerais Goiás ocupou a terceira posição. Esta mesma estirpe foi a mais provável em 27 propriedades das 109 trabalhadas (24,77%). A introdução de estirpes autóctones na coleção de antígenos da SAM propiciou a confirmação do diagnóstico de leptospirose em 594 animais (6,00%) classificados como não reagentes pela coleção de referência (*p*=0,001).

Palavras-chave: Leptospirose. Bovinos (fêmeas). Diagnóstico. Soroaglutinação microscópica. Estirpes autóctones.

ABSTRACT

ABSTRACT

SARMENTO, A. M. C. **Use of strains of leptospires isolated in Brazil, for the microscopic agglutination test applied to the diagnosis of leptospirosis in bovine herds of eight Brazilian states**. [Emprego de estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros]. 2009. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Bovine leptospirosis is one of the main reproductive diseases which interferes economically on the livestock and thus it is needed the amelioration of the laboratory diagnostic procedures. The aim of this work is to investigate the adequacy to use autochthonous strains of leptospires isolated in Brazil, added into the antigen collection applied for the microscopic agglutination test (MAT). The reference antigen collection was constituted by the following serovars: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippothyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Patoc and Sentot. The ten strains isolated in Brazil included the serovars: Bananal (two strains), Brasiliensis, Canicola (three strains), Copenhageni, Guaricura and Pomona (two strains). By means of non-probability sampling, 109 farms and 9,820 bovines, females at reproductive age were chosen from the 84 municipalities of the states of Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo . Among the 9,820 examined animals, 5,806 (59.12%) were reactants to the MAT for any serovar using the 23 reference serovars. Using the collection of reference serovars and the ten autochthonous strains there were 6,400 (65.24%) reactants, and the difference found was significant (p=0.001). The only state with non-significant results in the number of reactants for any serovar was the State of Santa Catarina (p=0.522). Of the 109 properties analyzed, 106 were considered positive at least with one reactant animal by MAT. According to the antigens used, there was no significant difference among the properties. The most probable serovars identified by the collection of reference antigens were Hardjo (43.03%), Shermani (20.00%), Wolfi (9.96%), Grippothyphosa (5.42%) and Pomona (4.28%). With the collection amplified with the ten strains isolated in Brazil, the most probable serovars were Hardjo (31.00%), Guaricura – M4/84 (22.50%), Shermani (15.43%), Wolffi (4.76%), Grippothyphosa (3.71%) and Autumnalis (3.24%). The serovar Guaricura, strain

M4/84, isolated from bovines and buffaloes in the State of São Paulo, was ranked at the first place as the most probable serovar in the State of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, but the differences observed with the serovar Hardjo were significant only in Mato Grosso (*p*=0,0001). In São Paulo State, the Guaricura serovar was the second most probable and in the states of Minas Gerais and Goiás the third one. This same strain was the most probable in 27 properties among the 109 examined (24.77%). The addition of autochthonous strains into the MAT antigen collection provided the confirmation of the diagnosis of leptospirosis in 594 animals (6.00%) which have been classified as non-reactants by the reference collection.

Key words: Leptospirosis. Bovines (females). Diagnosis. Microscopic agglutination. Test . Autochthonous strains.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Brasil, representando os oito estados amostrados, as siglas nacionais correspondentes e a localização geográfica dos 85 municípios amostrados. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005.....69

Figura 2 - Mapa do Brasil, representando os oito estados amostrados e a proporção de bovinos sororeagentes a microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM) para leptospirose na coleção de 23 antígenos de referência, pelo total de bovinos examinados por estado.....84

Figura 3 - Mapa do Brasil, representando os oito estados amostrados e a proporção de bovinos sororeagentes na microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM) para leptospirose na coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes autóctones, pelo total de bovinos examinados por estado.....85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Coleção de antígenos de leptospiras de referência empregada na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo sorogrupo, sorovar, estirpe e instituição de origem. São Paulo, 2009.....72

Quadro 2 - Estirpes de leptospiras autóctones isoladas no Brasil e tipificadas pelas técnicas de anticorpos monoclonais, PFGE, seqüenciamento do gene 16S rDNA, VNTR, MSLT, segundo a espécie, animal de origem, código de identificação, técnica empregada e o respectivo resultado.São Paulo, 2009 73

Quadro 3 Sorovar de leptospira mais provável identificado em bovinos submetidos ao teste de SAM, com a coleção de 23 antígenos de referência e coleção ampliada por dez estirpes autóctones isoladas no Brasil, segundo o número de identificação da propriedade. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005. São Paulo, 2009.....86/87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bovinos, fêmeas em idade de procriar, submetidos ao inquérito sorológico para a leptospirose segundo código de identificação da propriedade e o número de animais examinados por propriedade e a sigla do estado correspondente. Colheitas efetuadas no período de março de 2004 a maio de 2005. São Paulo, 2009.....68

Tabela 2 - Bovinos fêmeas em idade de procriar, submetidos ao teste de soroaglutinação microscópica aplicado ao diagnóstico da leptospirose com uma coleção de 23 sorovares de referência e com a coleção de 23 sorovares de referência acrescida de dez estirpes autóctones, segundo o estado de origem e a natureza do resultado obtido para qualquer sorovar. São Paulo, 2009 82

Tabela 3 - Sorovar de leptospira mais provável identificado em inquérito sorológico efetuado pelo teste da SAM em 109 propriedades distribuídas em oito estados brasileiros segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005. São Paulo, 2009.....88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Proporção de sorovares de *Leptospiras spp* mais prováveis em bovinos fêmeas de oito estados do Brasil, identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) com a coleção de 23 antígenos de referência. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005..... 87

Gráfico 2 - Proporção de sorovares de *Leptospiras spp* mais prováveis em bovinos fêmeas em oito estados do Brasil, identificados pela identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) com a coleção de 23 sorovares de referência e dez estirpes autóctones. Colheitas efetuadas de março 2004 a maio de 2005..... 88

Gráfico 3 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) em rebanhos de bovinos do Estado de **Goiás**, segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005..... 89

Gráfico 4 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) em rebanhos de bovinos do Estado de **Mato Grosso**, segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005.....90

Gráfico 5 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) em rebanhos de bovinos do Estado de **Mato Grosso do Sul**, segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005.....91

Gráfico 6 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) em rebanhos de bovinos do Estado de **Minas Gerais**, segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005.....92

Gráfico 7 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) em rebanhos de bovinos do Estado de **Paraná**, segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005.....93

Gráfico 8- Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) em rebanhos de bovinos do Estado de **Rio Grande do Sul**, segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005.....94

Gráfico 9- Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) em rebanhos de bovinos do Estado de **Santa Catarina**, segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005

Gráfico 10 Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) em rebanhos de bovinos do Estado de **São Paulo,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

BVD	Diarréia viral bovina
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
EMJH	Ellinghausen e McCullough modificado por Jhonson e Harris
EUA	Estados Unidos da América
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FPZ-SP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo
GO	Goiás
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
L.	*Leptospira*
LPS	Lipopolissacarídeo
LZB	Laboratório de Zoonoses Bacterianas
MAbs	anticorpos monoclonais
MG	Minas Gerais
MLST	“Multilocus Sequence Typing”
MLVA	Multilocus VNTR Analysis””
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
OMS	Organização Mudial de Saúde
PFGE	“Pulsed Field Gel Eletrophoresis”(eletroforese de campo pulsado)
PR	Paraná
rDNA	DNA que codifica o RNA ribossômico
RNA	Ácido Ribonucléico
RS	Rio Grande do Sul
SAM	Microtécnica de Soroaglutinação Microscópica
SC	Santa Catarina

SP	São Paulo
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFP	Universidade Federal de Pelotas
USP	Universidade de São Paulo
VNTR	“Variable Number of Tandem Repeats”(Número variável de repetições em “Tandem”)
VPS	Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal
WHO	“World Health Organization”

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
°C	graus Celsius
µm	micrometro
µl	microlitro
g	grama
X	vezes
pH	potencial hidrogeniônico
1 M	um molar
NaCl	cloreto de sódio

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....37

2 REVISÃO DE LITERATURA.....41

2.1 Histórico.....42
2.2 Conceito.....43
2.3 Etiologia e caraterísticas do agente.....44
2.4 Epidemiologia.....45
2.5 Patogenia.....48
2.6 Diagnóstico.....50
2.6.1 Métodos diretos.....**50**
2.6.2 Métodos indiretos.....**52**
2.7 Tipificação de estirpes isoladas.....55
2.8 Inquéritos sorológicos de leptospirose bovina no Brasil.....57
2.9 Emprego de estirpes de leptospiras isoladas localmente na coleção de antígenos da reação de SAM 59

3 OBJETIVOS.....63
3.1 Objetivo geral.....64
3.2 Objetivos específicos.....64

4 MATERIAL E MÉTODOS.....63
4.1 Banco de soros.....64
4.2 Critérios utilizados para escolha das propriedades, quantidade de propriedades e número de animais por propriedade.....64
4.3 Prova de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos aplicada ao diagnóstico da leptospirose.....70
4.4 Triagem.....70
4.5 Titulação.....71
4.6 Leitura e intrepretação.....71

4.7 Histórico das estirpes de leptospiras isoladas no Brasil empregadas no teste de SAM para o diagnóstico de leptospirose bovina.....74
4.8 Análise estatística.....79
4.8.1 Estatística descritiva.....79
4.8.2 Inferência estatística.....80
5 RESULTADOS.....81
6 DISCUSSÀO.....99
7 CONCLUSÒES.....105
REFERÊNCIAS.....107
APÊNDICES.....125
ANEXOS.....135

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino do mundo e é o maior exportador mundial de carne. De 1990 a 2003, a pecuária brasileira registrou um crescimento espetacular, a produção de carne bovina aumentou 85,2% ou 6,1% ao ano, passando de 4,1 milhões para 7,6 milhões de toneladas. Em 2005 a bovinocultura brasileira era praticada em quatro milhões de propriedades rurais, com 207.156.696 cabeças de gado. Em 2006, com 205.886.244 cabeças de gado, o Brasil tornou-se o maior produtor (8,5 milhões de tonelada de carcaças) e maior exportador de carne bovina. O país também é considerado pelo Comitê Veterinário da União Européia como "área de risco desprezível" para a ocorrência de encefalomielite espongiforme bovina, doença que dizimou populações inteiras na Europa e em 1993 chegou à América do Norte.

A criação de gado comercial tem como principal objetivo a produção de carne bovina de qualidade para alimentação humana, além de fornecer matéria prima para a indústria: farmacêutica, cosméticos, calçados, roupas e rações. A carne bovina brasileira passou a ser largamente consumida nas mais diversas partes do mundo.

No setor de lácteos, o Brasil é o sétimo produtor mundial com cerca de 23,3 bilhões de litros de leite produzidos em 2005. Neste setor, Brasil, Argentina, Austrália, Índia, China, Polônia e Ucrânia são países com grande competitividade em custo de produção mundial.

A despeito do Brasil ser o líder mundial em tonelagem de carne bovina exportada, os níveis de produção e produtividade dos rebanhos de corte e leite brasileiros ainda são muito baixos. Além da questão da presença de aftosa nos rebanhos, a carne brasileira, segundo alguns importadores, não é considerada de boa qualidade. Diversos fatores contribuem para esta condição: características genéticas, nutricionais, metabólicas e também aspectos sanitários, dentre os quais se destacam as doenças infecciosas e parasitárias que comprometem a reprodução como: rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarréia viral bovina (BVD), brucelose, leptospirose, campilobacteriose, neosporose e a tricomonose. Estas infecções estão disseminadas no rebanho nacional, havendo a necessidade do aprimoramento dos respectivos recursos terapêuticos e profiláticos. Dentre tais doenças a leptospirose

ocupa uma posição de destaque, pois as condições climáticas e ambientais vigentes no Brasil são muito favoráveis à sua ocorrência.

No Brasil, as perdas econômicas produzidas pela leptospirose bovina estão relacionadas a falhas reprodutivas como: infertilidade, abortamento, natimortalidade, morte neonatal e nascimento de bezerros debilitados. Tais transtornos levam a queda da produção de carne e leite, além dos custos com a assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais.

No Brasil, a leptospirose é endêmica e está presente no rebanho bovino em quase todos os estados da federação. Os inquéritos sorológicos já efetuados têm encontrado percentuais de animais reatores da ordem de 15% a 74,5%, tendo como sorovares predominantes Hardjo, Wolffi e Pomona. Contudo os sorovares já isolados em rebanhos bovinos do Brasil e tipificados foram Pomona, Icterohaemorrhagiae, Guaicurus, Goiano, Hardjo (Hardjoprajitno) e Georgia.

O sorovar Hardjo é o mais importante e o de maior impacto econômico na eficiência reprodutiva de rebanhos de bovinos no Brasil e em diversas partes do mundo. O sorovar Wolffi já foi predominante em inquéritos sorológicos efetuados no Brasil, quando o sorovar Hardjo ainda não havia sido incluído nas coleções de antígenos. Contudo tais reações podem ter sido reações cruzadas entre membros do sorogrupo Sejroe como o Hardjo (Hardjoprajtino), Wolffi e Guaricura.

A profilaxia e o controle da leptospirose dependem da identificação do sorovar e dos seus respectivos hospedeiros de manutenção que deverão ser objeto das ações de controle. No caso de infecções incidentais, determinadas por sorovares que não são mantidos pelos bovinos, como Pomona, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa, entre outros, deve-se identificar de que forma o rebanho está sendo exposto a possíveis reservatórios naturais, que no Brasil são respectivamente: suídeos, roedores e marsupiais.

O diagnóstico da leptospirose pode ser efetuado pela demonstração do agente (métodos diretos) e por métodos indiretos (provas sorológicas) que são os mais indicados para o controle em populações de animais. Destes, o mais eficaz é a soroaglutinação microscópica (SAM). Diversos fatores afetam a especificidade e a sensibilidade desta prova, tais como: coleção de estirpes empregadas como antígenos, idade e densidade dos cultivos, diluição final dos soros, temperatura e tempo de incubação.

A recomendação oficial para a prova da SAM aplicada à leptospirose é que a coleção de antígenos empregada contenha pelo menos um representante por sorogrupo, contudo tem sido aventada a importância da inclusão de sorovares autóctones isolados no país ou região o que aumentaria a capacidade discriminadora do teste.

Tendo em vista a importância econômica da pecuária bovina no Brasil, a interferência negativa das doenças transmissíveis da reprodução, a presença da leptospirose como uma das principais patologias implicadas em tal processo e a necessidade do aprimoramento dos sistemas de diagnóstico laboratorial atualmente disponíveis, foi delineado o presente trabalho que tem por objetivo investigar a conveniência do emprego de estirpes de leptospiras autóctones isoladas no Brasil, como antígenos incluídos na coleção de estirpes empregadas no teste de soroaglutinação microscópica aplicado a leptospirose.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 1 Histórico

Em 1886, Adolf Weil, na Alemanha descreveu minuciosamente os dados clínicos de quatro casos humanos de uma doença caracterizada por febre, icterícia, hemorragias, comprometimento hepático e renal. Esta foi a primeira descrição da leptospirose humana e Goldschmidt propôs que a enfermidade passasse a ser denominada Doença de Weil (CACCHIONE, 1962; SANTA ROSA, 1970, BRASIL, 1995) Em 1907, Stimsom, nos EUA (Estados Unidos da América), demonstrou por corantes de prata a presença de esquiroquetas nos túbulos renais de um paciente que veio a óbito e o denominou de *Spirochaeta interrogans* por causa da semelhança com o sinal de interrogação. No entanto, a etiologia da leptospirose só foi demonstrada em 1915 no Japão por Inada, Ido, Hochi, Kaneko, Ito e Matsuzaki que isolaram um microrganismo de forma espiralada do fígado de um cobaio que havia sido inoculado com o sangue de um minerador enfermo e o denominaram de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (CACCHIONE, 1962).

O gênero *Leptospira* foi proposto por Noguchi[1] (1916 apud CACCHIONE, 1962, p. 105), e em 1917, este mesmo autor identificou o papel do rato como fonte de infecção para humanos (LEVETT, 2001).

No Brasil as primeiras publicações sobre leptospirose datam de 1917 quando Bentes, Aragão e McDowell isolaram o sorovar Icterohaemorrhagiae do *Rattus norvegicus*. Outras investigações pioneiras sobre a presença de infecção em roedores sinantrópicos foram efetuadas por Enrietti[2], (1954 apud MEIRA, 1991) em Curitiba (Paraná), e por Meira e Santa Rosa[3] (1964 apud MEIRA, 1991) em São Paulo.

---

[1]NOGUCHI, H. Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (Spirochaeta) *icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido) **Journal of Experimental Medicine**, v. 27, p. 575-592, 1918.
[2] ENRIETTI, M. A. Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospiras em murídeos, caninos e suínos no Paraná. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.9, n. 3, p. 21-72, 1954.
[3] MEIRA, D. A.; SANTA ROSA, C. A. Estudo epidemiológico e clínico de leptospirose em detentos de São Paulo. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, São Paulo, v.19, p.163-172, 1964.

A primeira descrição da leptospirose bovina foi efetuada por Nikolski[1] (1935 apud YANAGUITA, 1972), no Cáucaso, Rússia, a doença foi descrita por manifestações icterohemoglobinúricas. Entretanto o primeiro isolamento de leptospiras de bovinos foi efetuado por Mikhin e Azinov[2] (1935 apud YANAGUITA, 1972) que isolaram a espiroqueta de um cobaio inoculado com sangue de um bezerro que veio à óbito com manifestações icterohemoglobinúricas (YANAGUITA, 1972 ,CORREA; CORREA, 1992, BROD et al., 1995). No Brasil, o primeiro isolamento de leptospiras em bovino tipificado como do sorovar Pomona foi efetuado por Freitas et al. (1957), posteriormente foram confirmados os isolamentos dos sorovares Icterohaemorrhagiae (SANTA ROSA et al., 1961); Guaicurus e Goiano (SANTA ROSA et al., 1980); Hardjo (Hardjoprajitno) e Georgia por Moreira (1994). O nome do sorovar Guaicurus cadastrado no banco internacional de estirpes foi erroneamente registrado como Guaricura. Em 1998 uma nova estirpe deste sorovar foi isolada da urina de búfalas do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo e o nome adotado foi o constante do banco, Guaricura (VASCONCELLOS et al., 2001).

2.2 Conceito

A leptospirose é uma antropozoonose, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, de elevada prevalência em animais silvestres e domésticos, de distribuição mundial, caracterizada por vasculite generalizada O homem é introduzido na cadeia epidemiológica desta patologia de maneira acidental (FEIGIN; ANDERSON, 1975). A sua distribuição geográfica é cosmopolita, no entanto, na América Latina, África e Ásia, os níveis de ocorrência são elevados, pois as condições ambientais de ordem físico-química e sócio-econômico-cultural favorecem a persistência e a disseminação da infecção (VASCONCELLOS, 2004).

No âmbito internacional, o interesse pela leptospirose provem das epidemias e calamidades que tem sido registradas devido aos desequilíbrios climáticos e ecológicos, como chuvas em excesso, maremotos e ciclones que não se restringem apenas as regiões tropicais (LEVETT, 2001; HARTSKEERL, 2009; OLIVEIRA et al.,

[1] NIKOLSKI, et al. In “ Le Leptospirosis” Tipografia del seminario di padova, p.533, 1953.
.[2] MIKHIN, N. A.; AZINOV, S. A. Vet. Bull, Imp. Agric. Bur. Aberystwyth, Wales, 7:419, 1937.

2009; SEHGAL, 2009). Assim a leptospirose tem sido identificada como doença re-emergente, particularmente na Nicarágua, Brasil, India, Malásia (PALANIAPPAN et al., 2007), Tailândia, Indonésia, América Latina e Estados Unidos (LEVETT, 2001; HARTSKEERL, 2009).

2.3 Etiologia e características do agente

As leptospiras são microrganismos pertencentes à ordem *Espirochaetales*, família *Leptospiraceae,* gênero *Leptospira* proposta por NOGUCHI (1918 apud FAINE et al., 1999) São bactérias aeróbicas, não capsuladas, nem esporuladas, delgadas (CORRÊA; CORRÊA, 1992) e helicoidais (espiroquetas) com extremidades em forma de gancho. As leptospiras têm 6-20 µm de comprimento por 0,1 µm de diâmetro. Os membros dessa ordem são móveis por dois filamentos axiais (endoflagelos) com inserções polares localizados no espaço periplasmático (FAINE et al., 1999, LEVETT, 2001; QUINN et al., 2005).

As leptospiras têm uma membrana dupla típica em que a membrana citoplasmática e a parede celular, constituída por peptidioglicano, estão intimamente ligadas e recobertas pelo envelope externo. Os lipopolissacarídeos das leptospiras têm composição similar ao de outras bactérias Gram negativas, porém com baixa atividade endotóxica (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

As leptospiras crescem em pH levemente alcalino (7,2-7,6) e em temperaturas de 28 a 30 ° C (FAINE et al., 1999), multiplicam-se por fissão transversa e apresentam movimentos do tipo ”saca-rolhas” e de flexão-extensão. Elas são visíveis à microscopia óptica de campo claro quando coradas por sais de prata como Gomori, argentometanoamina, Levaditi e Warthin-Starry ou são visualizadas em preparações a fresco por microscopia de campo escuro e de contraste de fase (MYERS, 1985; CORRÊA; CORRÊA, 1992; LEVETT, 2001).

Com base em características culturais e morfológicas as leptospiras eram subdivididas em duas espécies: *L. interrogans, sensu lato* e *L. biflexa, sensu lato*. A primeira patogênica para o homem e para os animais e a segunda, saprófita de vida livre, encontrada em águas superficiais, com raros registros de infecções nos mamíferos (FAINE et al., 1999; ACHA; SZYFRES, 2001; LEVETT, 2001, BARTHI et al., 2003; WHO, 2003; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009). As duas espécies eram

diferenciadas pela capacidade de crescimento a 13°C na presença de 8-azaguanina, substância análoga da purina e pela incapacidade da *L. biflexa* formar células esféricas em NaCl 1 M (WHO, 2003; LEVETT, 2001). As estirpes patogênicas apresentam um tempo de geração de 20 horas e são consideradas bactérias de crescimento lento. As saprófitas crescem mais rapidamente em aproximadamente cinco horas (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

As características antigênicas decorrentes de antígenos de natureza lipopolissacarídica (LPS) da parede celular das leptospiras permitem o estabelecimento de uma classificação sorológica, onde a unidade taxonômica do gênero é o sorovar. Na atualidade são reconhecidos cerca de 260 sorovares para as espécies patogênicas que por parentesco antigênico são reagrupados em 30 sorogrupos (FAINE et al., 1999; PALANIAPPAN et al., 2007; ADLER; PEÑA MOCTEZUMA, 2009; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

Yasuda et al. (1987) demonstraram por hibridização do DNA que as estirpes de *Leptospira interrogans sensu lato* não eram uma única espécie, mas que na verdade poderiam ser subdivididas em seis espécies distintas. Investigações subseqüentes ampliaram este número, e, na atualidade, são aceitas 20 espécies distintas: *L. interrogans sensu stricto*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L.* weilii, *L. kirshneri*, *L. fainii, L. alexanderi*, *L. alstonii, L. wolffii, L. licerasiae, L. broomii*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi, L. vanthiellii, L. terpstrae, L. yanagawae*. Contudo, foi observado que não existe correlação entre a classificação sorológica e a genotípica, pois um dado sorogrupo é freqüentemente encontrado em diversas espécies (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

2.4 Epidemiologia

Os fatores que contribuem para a ocorrência da leptospirose incluem o clima quente e úmido, tal como acontece no verão chuvoso das regiões tropicais e subtropicais; o relevo e o tipo de solo com destaque para as baixadas e várzeas alagadiças bem como os aglomerados urbanos construídos em locais que, além de possuírem as características anteriores, não tem infra-estrutura de saneamento

básico, o que propícia o acúmulo de lixo e favorece a proliferação de roedores (KO et al., 1999; LOMAR et al, 2000; LOMAR et al., 2002).

No Brasil a leptospirose humana tem ocorrido especialmente nas cidades em que as condições topográficas, de saneamento básico e de precipitação pluviométrica são favoráveis como Rio de Janeiro, São Paulo, Salvador e Recife (KO et al., 1999; PEREIRA, 2005).

As leptospiras patogênicas são capazes de infectar animais domésticos, silvestres e o homem, determinando quadro clínico variável de infecção subclínica à doença grave e fatal. Os casos subclínicos podem resultar freqüentemente, no estado de portador renal crônico, importante fator para a transmissão da zoonose (FAINE et al, 1999).

Entre os animais domésticos, os suínos, bovinos e os cães são mais afetados que os eqüinos, caprinos e ovinos. Não há especial predileção por sexo e faixa etária (FAINE, 1982; PEREIRA, 2005). Já entre os animais silvestres os roedores e os marsupiais são os principais reservatórios de leptospiras em ecossistemas não modificados. Do ponto de vista da saúde pública, o principal reservatório de leptospiras é o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) que alberga o microrganismo nos rins, especialmente os componentes do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (STERLING & THIERMANN, 1982; FAINE, 1982).

Saliente-se que nos roedores sinantrópicos a relação hospedeiro-parasita revela uma condição de equilíbrio, na qual os animais acometidos usualmente não exteriorizam qualquer sinal da infecção (VASCONCELLOS, 1987; VASCONCELLOS, 2004). Estes animais são considerados portadores universais (GONÇALVES et al., 1981).

As chuvas fortes e conseqüentes enchentes são fatores predisponentes que podem originar epidemias em seres humanos (GONÇALVES et al., 1981). Nestas ocasiões a leptospirose é transmitida por contato indireto com água, solo, vegetação e alimentos contaminados pela urina, de uma grande variedade de animais silvestres e domésticos (TURNER, 1967; MYERS, 1985). A transmissão humano a humano ocorre muito raramente (BOLIN; KOELLNER, 1988).

Na espécie bovina a transmissão da leptospirose pode ocorrer de forma indireta pelo contato com água e solos contaminados por urina, fetos abortados, placenta, secreções uterinas e também por contágio direto principalmente pela forma

venérea (AMATREDJO et al., 1975), transplacentária e até pelo hábito de lambedura da genitália, escroto, tetas e outras partes do corpo (CABRAL, 1999). A presença de leptospiras no sêmen de touros natural ou experimentalmente infectados já foi demonstrada, tornando possível a transmissão da leptospirose bovina pela monta natural ou inseminação artificial (SLEIGHT et al., 1964; SLEIGHT, 1965).

Os animais domésticos e silvestres na fase crônica da leptospirose eliminam leptospiras pela urina (CORRÊA; CORRÊA, 1992). A excreção urinária de leptospiras é intermitente e pode ser de longa duração, na dependência dos hospedeiros acometidos e do sorovar envolvido. Nos animais de produção, as leptospiras têm sido evidenciadas tanto na urina como no sêmen e em corrimentos vaginais o que confirma a colonização dos órgãos da reprodução e de suas glândulas anexas (ELLIS, 1994). Os bovinos costumam ter leptospirúria usualmente por 60 a 90 dias (CORRÊA; CORRÊA, 1992), contudo há registros de períodos superiores a um ano (THIERMANN, 1984).

Os diferentes sorovares de leptospiras podem apresentar uma ampla diversidade de associações que influenciam a instalação e disseminação da infecção, assim são considerados: tipo de exposição, reservatórios primários e secundários, quadros clínicos e condições ambientais. Há também interações estabelecidas com o panorama ecológico da região, que incluem precipitações pluviométricas, temperaturas médias, umidade e pH do solo (ADLER; FAINE, 1978; CHAPMAN et al., 1987; LEVETT, 2001).

Existe uma relação estreita entre determinados sorovares e algumas espécies de animais consideradas como hospedeiros primários de manutenção. O sorovar Copenhageni é freqüentemente isolado de ratos, o Canicola, de cães, o Pomona de suínos, Grippotyphosa de animais silvestres e o Hardjo, de bovinos (VASCONCELLOS, 2004).

O sorovar Hardjo tem sido considerado como o mais adaptado a espécie bovina, podendo ocorrer infecção independente das estações chuvosas e sistemas de criação (ELLIS, 1994). Apresenta dois tipos distintos, Hardjoprajtino e Hardjobovis, que diferem tanto na distribuição geográfica como na virulência. O Hardjobovis ocorre com maior freqüência na Nova Zelândia, Austrália e Holanda (FAINE et al., 1999). O Hardjoprajtino ocorre na Nigéria, Índia, Malásia, Brasil, México e Estados Unidos (AGUIAR, 2004).

2.5 Patogenia

A patogenia da leptospirose inclui a penetração ativa dos microrganismos nas mucosas e pele escarificada. A penetração da pele íntegra pode ocorrer em condições especiais que favoreçam a dilatação dos poros, como durante a permanência por tempo prolongado em coleções de águas contaminadas (MYERS, 1985; CORRÊA; CORRÊA, 1992, VASCONCELLOS, 2004).

As leptospiras multiplicam-se ativamente no interstício e nos humores orgânicos (sangue, linfa e líquor), caracterizando um quadro agudo, septicêmico (leptospiremia). As lesões primárias são atribuídas à ação mecânica do microrganismo nas células endoteliais de revestimento vascular. As conseqüências diretas da lesão dos pequenos vasos são as hemorragias, seguidas da formação de trombos e do bloqueio do aporte sanguíneo nas áreas acometidas (FAINE, 1982; VASCONCELLOS, 2004).

Os sinais clínicos apresentados pelos animais infectados são variáveis de acordo com a extensão das lesões e o tipo de órgão acometido. Se os mecanismos de defesa do hospedeiro suplantam as lesões e conseqüentes alterações funcionais, o segundo período clínico é atingido referido como de imunidade (presença de anticorpos circulantes) e de leptospirúria (presença de leptospiras na urina). Nesta etapa ocorre a colonização dos túbulos renais, local privilegiado onde o agente fica protegido da imunidade humoral (FAINE et al., 1999; VASCONCELLOS, 2004)

A partir da instalação do período de imunidade e leptospirúria, algumas lesões poderão ser estabelecidas, devido a persistência do microrganismo em locais específicos, onde ocorrem reações de hipersensibilidade do tipo III, decorrentes da deposição de imunocomplexos formados "*in vivo*". É a partir deste mecanismo que são explicadas a nefrite intersticial crônica e a uveíte (TURNER, 1967; VASCONCELLOS, 2004).

Os sinais clínicos da leptospirose bovina vão de quadros inaparentes a formas agudas, febris e severas. A manifestação clínica não é específica ou patognomônica e não há diferenças entre os sinais causados pelos diferentes sorovares (FAINE, 1994).

Nos bovinos, em casos mais graves, têm sido observados: temperatura de 40 a 41 graus Celsius por três a sete dias, acompanhada de anorexia, depressão, discreta diarréia e às vezes hemoglobinúria, paresia ou paralisia do rúmen. Mais tarde podem ocorrer abortamentos. Nos bezerros há letargia, febre, anorexia e discreta anemia e alguns animais podem apresentar rigidez dos membros posteriores. A icterícia é um sinal muito raro (CORREA; CORREA, 1992).

Em alguns casos de infecção de bovinos jovens pelo sorovar Pomona pode ocorrer a morte e o animal revela ligeira icterícia, acentuado acúmulo de líquido avermelhado e serogelatinoso em diversas regiões corporais, repleção da bexiga urinária com urina de cor cereja. Na necrópsia dos fetos é encontrada grande quantidade de líquido avermelhado nas cavidades torácica e abdominal, edema subcutâneo e manchas brancas nos rins. Os envoltórios fetais aparecem edematosos. Os cotilédones estão alterados, com coloração castanho-clara ou amarela (RIET-CORREA; LEMOS, 2001).

Na leptospirose bovina o abortamento pode ocorrer predominantemente no terceiro trimestre de gestação e tem uma característica epizoótica, com desenvolvimento de imunidade para o sorovar envolvido. Entretanto podem ocorrer novos surtos com outros sorovares (RICHTZENHAIN et al., 2002).

A inoculação experimental de bovinos com o sorovar Hardjo confirmou de maneira insofismável a ação do microrganismo na etiologia do abortamento, mumificação fetal, natimortalidade e nascimento de bezerros fracos prematuros ou a termo que vem a óbito logo após o nascimento (ELLIS et al., 1986).

A interferência na reprodução é conseqüência da persistência do agente no trato genital (GUIMARÃES et al., 1982; ELLIS et al., 1985; PEREIRA et al., 2004), em touros a infecção pode ocasionar infertilidade (GUIMARÃES et al., 1982).

A ocorrência de mastite associada a leptospirose foi relatada por Sullivan (1970) e Higgins et al. (1980). Nos casos observados as vacas apresentavam o úbere flácido, sem os sinais de reação inflamatória e o leite amarelado com estrias de sangue, ocasionando elevada redução na produção láctea (ELLIS et al, 1986).

Algumas vacas infectadas por leptospiras, principalmente pelo sorovar Hardjo, apresentam leite espesso, amarelado, às vezes com sangue. A seguir ocorre a diminuição em 80% ou mais do volume de leite produzido. O retorno da produção ao normal pode levar de dez a 15 dias (CORRÊA, CORRÊA, 1992).

Existem fatores que modificam a apresentação clínica da doença tais como o estado de imunidade do rebanho, a idade em que os animais foram infectados, o estágio de gestação, o tipo de manejo e a aptidão (FAINE, 1994).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose animal tem como base a associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e provas laboratoriais. Dentre as provas laboratoriais existem os métodos diretos, que demonstram a presença do microorganismo ou do seu DNA e os métodos indiretos, que demonstra a presença de anticorpos induzidos pelo agente etiológico.

2.6.1 Métodos diretos

As provas laboratoriais diretas incluem: microscopia de campo escuro, cultura, inoculação em animais de laboratório, histopatologia, visualização em campo claro com corantes especiais, imunohistoquímica e imunofluorescência direta (FAINE, 1982), bem como as técnicas moleculares que revelam a presença do DNA das leptospiras (BOLIN, 1996; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2004).

Os animais de laboratório são de muita utilidade para o isolamento de leptospiras, inclusive como meio de manutenção de estirpes que não se adaptam aos meios de cultura. São usados cobaias ou hamsters, recém desmamados; inoculados pela via intraperitoneal com sangue, triturados de órgãos ou urina. Nas cobaias é efetuado o controle da temperatura retal, com colheita de sangue por punção cardíaca quando a temperatura é igual ou superior a 40º C (CACCHIONE, 1962; SANTA ROSA, 1970).

A microscopia de campo escuro pode detectar o microrganismo nos tecidos ou humores orgânicos, os resultados obtidos dependem da fase de evolução da infecção: sangue e líquido cefalorraquidiano, na fase aguda (leptospiremia), urina na fase crônica (leptospirúria). É um método rápido, porém apresenta baixa

sensibilidade e especificidade, pois a presença de artefatos nos fluidos corporais podem dificultar a visualização das leptospiras (BOLIN, 1996; BOLIN; ALT, 1999).

As técnicas de impregnação pela prata são utilizadas rotineiramente para a identificação de alguns tipos de espiroquetas; entretanto alguns inconvenientes como problemas de estabilidade dos reagentes, custo elevado, falha em identificar microorganismos ou seus produtos antigênicos, coloração de estruturas não identificadas como leptospiras, podem limitar a sua utilização (ALVES, 1987; SCANZIANI, 1989).

Outras técnicas têm sido desenvolvidas para a detecção de leptospiras nos tecidos tais como a imunofluorescência direta e a imunohistoquímica, porém estão restritas a estudos experimentais com pouca aplicação no diagnóstico de casos clínicos (LEVETT, 2001).

As técnicas baseadas na utilização do DNA introduzidas no final da década de 80 apresentam rapidez, praticidade e alta sensibilidade analítica (200 a 2000 bactérias/ml), porém são gênero específicas, não diferenciam sorovares patogênicos de não-patogênicos e não permitem a identificação dos sorovares de leptospiras causadores da infecção, o que é de grande importância epidemiológica e profilática (HEINEMANN et al., 1999; HEINEMANN et al., 2000; RICHTZENHAIN et al. 2002; ADLER; PEÑA MOCTEZUMA, 2009).

As leptospiras são cultivadas em meios especiais, de preferência contendo soro de coelho. Um dos meios sintéticos mais utilizados para o seu isolamento e manutenção por um período de pelo menos três meses é o meio semi-sólido, de Fletcher. Os cultivos são incubados a temperatura de 28° C a 30° C, durante pelo menos seis semanas. As observações são semanais para a constatação do crescimento caracterizado por um discreto anel de opalescência sub-superficial (TURNER, 1970; LEVETT, 2001)

O meio líquido de Ellinghausen e McCullough modificado por Jhonson e Harris (EMJH) enriquecido com albumina bovina e ácidos graxos presta-se bem para o isolamento primário e também é muito utilizado para a manutenção dos antígenos empregados na prova de soroaglutinação microscópica (ELLINGHAUSEN; McCULLOUGH, 1965).

Os meios de cultivo para as leptospiras tornam-se seletivos pela adição de vários antimicrobianos, sendo o mais comum: o 5-fluorouracil e o sulfato de

neomicina, embora a polimixina B, a rifampicina e a vancomicina também possam ser utilizados (FAINE et al., 1999).

Entre os vários métodos de diagnóstico laboratorial da leptospirose, o isolamento bacteriano é o único que permite a identificação definitiva do sorovar infectante, informação necessária para a condução de estudos epidemiológicos e orientação das estratégias profiláticas (SANTA ROSA, 1970; VASCONCELLOS, 1987; BOLIN; ALT, 1999; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2007). O isolamento de leptospiras pode ser efetuado "*in vivo*" em fluidos corporais e "*post-mortem*" em materiais como fígado, rins, cérebro. Em fetos abortados os materiais de escolha são os órgãos e o conteúdo estomacal (FAINE, 1982).

2.6.2 Métodos indiretos

Dentre os métodos laboratoriais indiretos que demonstram a presença de anticorpos têm sido empregadas: provas de soroaglutinação (macroscópica, microscópica, aglutinação em látex, hemaglutinação), fixação de complemento, imunofluorescência indireta e ELISA (TURNER, 1968; FAINE, 1982; BRASIL, 1995; SAENGJARUK et al., 2002). Cada um destes procedimentos tem as suas particularidades em termos de mecanismo das reações e classes de imunoglobulinas envolvidas.

As leptospiras induzem uma rápida produção de anticorpos, principalmente do tipo IgM. As imunoglobulinas das classes IgA e IgG apresentam aumento mais discreto em fase evolutiva posterior. As reações de soroaglutinação podem ser microscópicas ou macroscópicas. Para cada reação de soroaglutinação microscópica, devem ser utilizados como antígenos os diversos sorovares de leptospiras. Por essa razão tais exames não são realizados rotineiramente por qualquer laboratório, ficando restritos aos mais especializados (BRASIL, 1995, RAMADASS et al., 1999).

O teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos aplicado ao diagnóstico da leptospirose (SAM) é o procedimento aceito como padrão-ouro de referência internacional (BRASIL, 2005). Esta técnica foi desenvolvida em 1918 por

Martin; Petit (PEROLAT, 2003) e aprimorada por Galton et al. (1965) e Cole et al. (1973).

Na SAM, os anticorpos presentes no soro reagem com os epítopos dos lipopolissacarídeos (LPS), presentes na superfície das leptospiras (FAINE , 1994; LEVETT, 2001).

Os antígenos empregados na SAM são culturas de estirpes padrão de leptospiras, mantidas por repiques semanais em meio líquido: Stuart, Ellinghausen ou similares. Só devem ser usados como antígenos culturas de quatro a 14 dias de cultivo, que não apresentem contaminantes ou auto-aglutinação (BRASIL, 1995). A coleção de antígenos empregada na prova de soroaglutinação microscópica deve incluir representantes dos sorogrupos de todos os sorovares existentes no país ou na região para a espécie em questão. Contudo, a maioria das estirpes de referência pode ter sido isolada em regiões com condições bióticas e abióticas distintas da localidade onde o diagnóstico é efetuado (SEYFFERT et al., 2004).

Quando estirpes isoladas locais são introduzidas na coleção de antígenos da SAM, os títulos usualmente são mais elevados que os obtidos com as estirpes de referência e em algumas ocasiões são detectados animais reagentes que teriam sido negativos com a coleção de referência (LEVETT, 2001; SAENGJARUK et al., 2002, BROD et al., 2005).

Em testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da leptospirose podem ocorrer co-aglutinações, isto é, reações contra mais de um sorovar, pertencente ao mesmo sorogrupo ou inclusive de sorogrupos distintos. Na interpretação de tais resultados o sorovar infectante, mais provável, é o que determina o título mais alto e persistente. Reações paradoxais também podem ser observadas quando, eventualmente títulos mais elevados são obtidos com um sorovar distinto do infectante (TURNER, 1968, VASCONCELLOS, 2004).

No exame de indivíduos o diagnóstico sorológico da leptospirose pode ser firmado com segurança quando o título de aglutininas aumenta quatro vezes em relação ao valor inicial. Na sorologia pareada o intervalo entre amostras deve situar-se entre dez a 15 dias. Brod (2002) observou a quadruplicação de título na segunda amostra de soro, somente em 3,3% de 200 pacientes humanos. É importante ressaltar que os antibióticos podem impedir, ou retardar, o aparecimento de anticorpos, o que pode dificultar bastante a confirmação diagnóstica. No caso de

infecção natural títulos de anticorpos baixos podem persistir por longo tempo, provavelmente por toda a vida.

A técnica de SAM pode ser empregada para vigilância epidemiológica da leptospirose com o monitoramento da distribuição espacial dos sorovares de leptospiras presentes em diferentes regiões (MASCOLLI et al., 2002).

Os resultados de testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da leptospirose dependem da técnica empregada, da coleção de antígenos utilizada, do ponto de corte da reação e também de variáveis relacionadas à localização das propriedades, período do ano em que as colheitas foram efetuadas e da movimentação dos animais (FAINE, 1982).

Dentre os pontos críticos apontados para o teste SAM aplicado ao diagnóstico da leptospirose são referidos: impossibilidade de diferenciar títulos de infecção dos decorrentes de vacinação, limitada capacidade para a identificação de portadores crônicos, volume de trabalho para a sua execução, risco em potencial para o pessoal de laboratório (BIANCIFIORI; CARDARAS 1983; YASUDA et al., 1991; BONFIM et al., 2005), e a detecção de anticorpos apenas após cinco a sete dias da exposição (PALANIAPPAN et al., 2007).

Na interpretação dos resultados da SAM a possível interferência de anticorpos pós-vacinais deve ser considerada, pois a resposta de anticorpos aglutinantes pós-vacinais em bovinos persiste por um a três meses e eventualmente por até seis meses. Neste caso há a necessidade da análise da relação entre os sorovares reatores e os incluídos na vacina empregada (BOLIN, 1996).

A execução regular da SAM aplicada ao diagnóstico de leptospirose implica na manutenção e produção sistemática de uma coleção de estirpes de leptospiras (CARDARAS; BIANCIFIORI, 1983), o que exige um bom laboratório e pessoal treinado (RAMADASS et al., 1999), por isso a padronização desse teste é difícil e podem ocorrer resultados discordantes entre laboratórios (THIERMANN, 1984).

2.7 Tipificação de estirpes isoladas

A identificação de uma estirpe de leptospira isolada é efetuada originalmente, pelo teste de aglutinação cruzada de aglutininas com anti-soros policlonais preparados em coelhos o que permite a identificação do sorogrupo (WHO, 2003). A seguir é efetuado o teste de absorção de aglutininas. Para tal fim, há a necessidade de culturas-padrão, culturas em exame (estirpes isoladas) e seus respectivos anti-soros. No teste de absorção de aglutininas, o antisoro produzido com a estirpe isolada é absorvido com os membros do sorogrupo identificado, se ainda persistir pelo menos 10% do título aglutinante a amostra isolada é caracterizada como um novo sorovar (SANTA ROSA, 1970; MYERS, 1985; INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, 1987). Contudo esta metodologia é muito trabalhosa e pouca prática, consome tempo e requer a manutenção das coleções de mais de 270 estirpes de referência e seus respectivos anti-soros. Estes testes têm sido substituídos pelo emprego de conjuntos de anticorpos monoclonais e pelos procedimentos moleculares, como eletroforese de campo pulsado, "*pulsed field gel-electrophoresis*" (PFGE) e mais recentemente, "*Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR)", *Multi Locus VNTR Analysis* (MLVA) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST), contudo estas provas ainda não permitem a identificação de todos os sorovares de leptospiras conhecidos (ROMERO et al., 2009).

A tipificação com anticorpos monoclonais (MAbs) é uma tipificação convencional, baseada no reconhecimento das características antigênicas da estirpe isolada por um painel de anticorpos monoclonais de sorovares de referência (TERPSTRA et al., 1985; SEHGAL et al., 2000). Apesar de ser uma técnica ainda cara, o seu uso é justificado uma vez que os hibridomas que secretam os MAbs, possuem muitas vantagens em relação aos animais usados para a obtenção de anticorpos policlonais. Por outro lado, há a necessidade da aquisição de anticorpos monoclonais específicos contra o lipopolissacarídeo (LPS) dos diferentes sorovares existentes (CAMPBELL, 1991; WHO, 2003). Apesar desta técnica ser rápida, ela não identifica todos os sorovares (LEVETT, 2004). Esta metodologia tem sido efetuada pelo laboratório de referência credenciado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o Royal Tropical Institute em Amsterdam, Holanda (WHO, 2003).

As técnicas de biologia molecular, como eletroforese de campo pulsado (PFGE), a análise de microsatélites, como *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), o *Multi Locus VNTR Analysis* (MLVA) e o seqüenciamento gênico por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) são promissoras. Estes métodos apresentam como desvantagens a necessidade de grande quantidade de DNA altamente puro (PFGE), dificuldade de intercambialidade dos dados entre laboratórios (PFGE), limitação de aplicação a poucas espécies (VNTR ou MLVA) ou pouco polimorfismo e baixo poder discriminatório (MLST) (ROMERO et al., 2009).

Rotineiramente, a técnica de PFGE, pode ser aplicada para a determinação do tamanho de um genoma (LEVETT, 2001) e também é capaz de discriminar sorovares de leptospiras (HERRMANN et al., 1991; HERRMANN et al., 1992), com boa concordância com a sorotipagem (HERRMANN et al., 1992). Entre as limitações deste procedimento é referida: a incapacidade de diferenciação de alguns sorovares como Icterohaemorrhagiae e Copenhageni da *L. interrogans*, e o Arbórea e Castellonis, da *L. borgpertersenii*. Contudo 90% das estirpes isoladas podem ser identificadas por um único perfil de PFGE (LEVETT, 2001; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009). Esta técnica é laboriosa exige a manutenção de culturas vivas, com o risco de infecção do pessoal de laboratório (LINDSTEDT, 2005), emprega grandes volumes de cultivo e é considerada como padrão ouro entre os ensaios moleculares para identificação de sorovares (MIRAGLIA et al., 2008). Galloway e Levett (2008) têm procurado aprimorar este prodecimento de modo a oferecer uma técnica com maior praticidade

Uma técnica mais simples, baseada em ensaios por PCR, é a análise de microsatélites ou *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR). Este método é capaz de discrimar os sorovares de *L. interrogans* e *L. kirschneri*. Entretanto, apresenta limitações para ser expandida para coleções de sorovares pertencentes a outras espécies. Inicialmente sete locus (VNTR-4, VNTR-7, VNTR-9, VNTR-10, VNTR-11, VNTR-19 E VNTR-23) foram caracterizados pela presença de repetições, com base na seqüência do genoma de *L. interrogans* sorovar Lai estirpe 56601 (MAJED et al., 2005). Mais recentemente, foram caracterizadas novas regiões repetidas (VNTR-32; VNTR-33 e VNTR-42) com base no genoma da *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo estirpes L550 e JB197 (SALAUN et al., 2006). A variabilidade do número de repetições em cada um destes marcadores determina o sorovar (MAJED et al., 2005). Jouglard (2005) empregou esta técnica com seis lócus

VNTR-4, VNTR-7, VNTR-9; VNTR-10; VNTR-13; VNTR-19 em estirpes isoladas de animais no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, conseguindo tipificar sete de dez isolados.

A técnica *Multilocus sequence typing* (MLST), que emprega, o seqüenciamento parcial de genes de manutenção celular (AHMED et al., 2006; THAIPADUNGPANIT et al., 2007,), tem sido aplicada para a diferenciação das espécies de leptospira e na discriminação parcial dos sorovares de *L. interrogans* e *L. kirschneri.* Pela técnica de MLST, o polimorfismo contido nas seqüências dos genes-alvo é usado para a identificação de isolados associados a surtos e epidemias. A MLST é uma técnica molecular que não requer grandes quantidades de DNA, nem necessita de alto grau de pureza. Em função da simplicidade, confiabilidade, facilidade de interpretação dos dados gerados e baixo custo, este método pode ser aplicado como rotina em laboratórios de referência. (THAIPADUNGPANIT et al., 2007; ADLER; PEÑA MOCTEZUMA, 2009; AHMED et al., 2009; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009,).

A dificuldade existente para a tipificação de sorovares de leptospiras por métodos moleculares é que até o presente só foram seqüenciados seis genomas completos, dois da *L. interrogans* (Lai e Copenhageni), dois da *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo e duas estirpes de *L. biflexa* sorovar Patoc (ADLER; PEÑA MOCTEZUMA, 2009).

2.8 Inquéritos sorológicos de leptospirose bovina no Brasil

No Brasil, os primeiros inquéritos soroepidemiológicos de leptospirose bovina foram efetuados em São Paulo por Guida et al. (1959) e Santa Rosa et al. (1961). A freqüência de bovinos reatores foi respectivamente de 3,93% e 28,3%, com predomínio das variantes sorológicas Pomona, Grippotyphosa, Canicola e Icterohaemorrhagiae.

Nos anos 70 a 80, os inquéritos sorológicos da leptospirose bovina efetuados em diversos estados, bem como isoladamente no Rio de Janeiro, Bahia e Rio Grande do Sul encontraram percentuais de reatores variando de 15,5% a 74,5%,

com o predomínio do sorovar Wolffi (SANTA ROSA et al., 1969/1970; DORIA; SANTANA, 1976; CALDAS et al., 1977; ÁVILA et al., 1978; GIORGI et al., 1981; DORIA et al., 1982; VIEGAS et al., 1986), neste período o sorovar Hardjo ainda não havia sido incluído nas coleções de antígenos empregadas (LILENBAUM; SANTOS, 1995).

Moreira et al. (1979), em inquérito realizado em bovinos do Estado de Minas Gerais incluíram pela primeira vez o sorovar Hardjo na coleção de antígenos de diagnóstico encontrando 11,11% de reatores para este sorovar. Nesta investigação a proporção de reatores para os sorovares Wolffi e Pomona, ainda foram superiores as obtidas com o Hardjo. A partir de então, o sorovar Hardjo começou a ser crescente nas reações sorológicas de bovinos, no Brasil (MADRUGA et al., 1980).

A partir dos anos 90, as freqüências de bovinos reatores para leptospirose passaram a ser elevadas. No estado do Rio Grande do Sul, em bovinos de raças leiteiras, de rebanhos com problemas reprodutivos, o percentual de reatores para leptospirose foi 70,42%, enquanto que em rebanhos com ausência de problemas reprodutivos os percentuais de reatores foram 12,14%; os sorovares predominantes foram Hardjo, Wolffi e Pomona, (BROD et al., 1995). No estado da Bahia, as proporções de animais reatores para leptospirose foram da ordem de 80%, com predomínio dos sorovares Wolffi, Castellonis, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis e Tarassovi (CALDAS et al., 1993;1995/1996).

Nos inquéritos subseqüentes, o sorovar Hardjo passou a ser o predominante, no Rio de Janeiro, 30,68% (LILENBAUN; SANTOS, 1996), em vários estados do Brasil 76,78% (VASCONCELLOS et al., 1997), no pantanal Mato-Grossense 60% (PELLEGRIN et al., 1999) e no estado do Pará 20,1% (NEGRÂO, 1999).

Na década dos anos 2000, os inquéritos sorológicos realizados em bovinos têm encontrado proporções de reatores similares para os sorovares Wolffi e Hardjo. No estado de São Paulo e Paraná, os valores obtidos foram próximos a 70% (LANGONI, 2000). No estado de São Paulo, nos municípios de Altinópolis e Santo Antônio da Alegria foram encontrados valores da ordem de 40% (BENEDICTO, 2003). No estado do Rio Grande do Norte, município de Mossoró, 50% (BARRETO JUNIOR et al., 2005).

Nos últimos inquéritos sorológicos efetuados, o sorovar Hardjo persistiu como predominante, com uma freqüência de animais reatores variando de 15% a 100% em vários estados brasileiros (FAVERO et al., 2001), ou isoladamente nos Estados

de Amazonas (HOMEM et al., 2001), São Paulo, (PEREIRA et al., 2004; MARTINS, 2005; CASTRO et al., 2008; LANGONI et al., 2006), Minas Gerais (ARAÚJO et al., 2005), Mato Grosso (TOCANTINS, 2007), Piauí (MINEIRO et al., 2007), Bahia (OLIVEIRA, 2008) e Mato Grosso do Sul (FIGUEIREDO et al., 2009).

2.9 Emprego de estirpes de leptospiras isoladas localmente na coleção de antígenos da reação de SAM

Faine et al. (1999) sugeriram que o emprego de estirpes locais antigenicamente identificadas poderia ampliar o poder discriminador do teste de SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose.

Pellegrin et al. (1999) examinaram 756 bovinos do Pantanal Mato-Grossense dos quais 287 (38,8%) foram reatores para leptospirose. Foram utilizadas 17 sorovariedades de leptospiras, das quais duas isoladas no Brasil por Moreira (1994), uma estirpe do sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) denominada de Norma e outra estirpe do sorogrupo Mini chamada Neguita provavelmente do sorovar Georgia, ambas isoladas na fazenda Cantagalo, no estado de Minas Gerais, município de Pitangui. Houve 62 (21,28%) animais reatores para o antígeno de referência Hardjo, 68 (23,13%) para o Wolffi de referência e 175 (59,52%) para estirpe autóctone Hardjo, Norma. Portanto, 107 bovinos (37,28 %) caracterizados como negativos com as estirpes de referência passaram a ser positivos com o emprego da estirpe autóctone.

Gangadhar et al. (2000) na Índia, após ter isolado 296 espiroquetas de 1348 culturas de rins de quatro espécies de roedores, recomendou a inclusão de *L. inadai*, espécie identificada em maior número, na coleção de antígenos de leptospiras empregada em estudos soroepidemiológicos.

Fontanals et al. (2001) na Argentina, verificaram pela técnica de "*imunoblotting*" que as estirpes do sorovar Pomona isoladas de bovinos naturalmente infectados eram distintas da estirpe de referência. Levantaram a hipótese de que tais diferenças pudessem influenciar o poder discriminador do teste diagnóstico.

Brod et al. (2002) empregando uma estirpe isolada da urina de um cão em Pelotas, Rio Grande do Sul (RS) denominada Tande e tipificada pela PCR por seqüenciamento do gene 16S rDNA, como *L. interrogans* e por VNTR como sorovar

Canicola (SILVA, 2004; JOUGLARD, 2005) constataram que média e mediana dos títulos obtidos com o isolado local foram mais elevados que os respectivos valores encontrados com a estirpe de referência. No inquérito sorológico canino, a importância do isolado foi mais evidente, pois a prevalência de 52,4% com a coleção de antígenos de referência, subiu para 71,4% quando foi incluído o isolado (BROD et al., 2005).

Herrmann et al. (2002) incluindo a estirpe regional Hardjo (Hardjoprajtino) Norma, na coleção de antígenos da SAM, aplicada ao diagnóstico de leptospirose em rebanhos de ovinos do RS, constatou que dos 233 ovinos classificados como reatores, 110 (8,09%) reagiram apenas para a estirpe isolada, 23 (1,69%) para a estirpe de referência Hardjo (Hardjoprajtino) e 100 (7,35%) para as duas variantes concomitantemente. Houve, portanto um acréscimo de 87 ovinos positivos com a estirpe Norma. Destacaram ainda que pesquisas com isolados locais são necessárias, pois estirpes mantidas indefinidamente em meios de cultura podem passar a apresentar características antigênicas distintas das que ocorrem no campo.

Seyffert et al. (2004) examinaram 314 seres humanos suspeitos de leptospirose comparando os resultados obtidos pela coleção de 18 sorovares patogênicos e um saprófita de referência com os encontrados com 44 sorovares patogênicos, três saprófitas, um leptonema de referência e dez estirpes isoladas locais, tipificadas por seqüenciamento do gene 16S rDNA e por VNTR (SILVA, 2004; JOUGLARD, 2005). Com a coleção de rotina constituída por 18 sorovares houve 47 (14,97%) reagentes, com a coleção ampliada de 58 sorovares (48 de referência e 10 estirpes isoladas locais), houve 251 (79,93%) reatores. Houve, portanto um aumento na proporção de reatores de 64,96% com a coleção ampliada. Apenas com as isoladas locais o acréscimo de reatores foi de 14 indivíduos, 36,31%.

Marchiori[1] (2003 apud SILVA 2004, p.26 e 27) empregou o teste da SAM aplicado ao diagnóstico de leptospirose em 99 equinos de oito municípios do RS, utilizando o isolado denominado Isoton É1, tipificado por seqüenciamento do gene 16S rDNA, como *L. interrogans* (SILVA, 2004) e por VNTR, como sorovar Djasiman (JOUGLARD, 2005). A prevalência obtida foi de 68,7%, a ausência da estirpe local

[1] MARCHIORI, M. O.; SILVA, É. F.; CARDOSO, M. C.; OLIVEIRA, L. C.; SILVEIRA, L.; BOURSCHEIDT, D.; RECUERO, A. L. C.; BROD, C. S. Prevalência de anticorpos anti-leptospira em equinos demonstra suscetibilidade dos animais analisados. In: Congresso de iniciação científica, 7; Encontro da Pós-Graduação, Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, n. 157, 2003.

diminuiria a prevalência para 64,6%, pois quatro animais seriam classificados como negativos.

No relatório do Centro de Controle de Zoonoses da Universidade Federal de Pelotas /CCZ/UFPel[1] (2003 apud SILVA, 2004, p.29.) foi constatado que a inclusão de estirpe isolada local, denominada Kito É3, tipificada por seqüenciamento do gene 16S rDNA, como *L. interrogans* (SILVA, 2004) e por VNTR como sorovar Canicola (JOUGLARD, 2005) o exame de 252 cães apresentou 53,7% de reatores, com títulos de 100 a 25.800. A ausência do isolado na coleção, determinou um decréscimo de 37,4% para 30%, com 70 animais caracterizados como falso-negativos.

Silva et al. (2004) utilizando o isolado Caco ÉD1, tipificado pelo seqüenciamento do gene 16S rDNA como *L. noguchi* sorovar Orleans ou sorovar Nicaragua, na coleção de SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose em ovinos, obtiveram o aumento de 20,5% para 25%, com dois animais falso-negativos que só reagiram com o isolado local, inclusive o ovino do qual a estirpe foi isolada.

Pereira et al. (2004) examinaram 252 bovinos de 33 rebanhos do Estado de Minas Gerais, utilizando como antígeno a estirpe Norma do sorovar Hardjo (Hardjoprajtino) isolada por Moreira (1994). Foram identificados 252 (36,57%) bovinos reatores para leptospirose, dos quais 237(34,39%) para estirpe Norma, 205 (29,75%) para Hardjo (Hardjobovis) de referência, 125 (18,28%) para Hardjo (Hardjoprajitno) de referência e 59 (8,63%) para o sorovar Wolffi de referência. A elevação da proporção de reatores com a introdução da estirpe Norma foi de 32 (12,7 %).

Araújo et al. (2005), no Estado de Minas Gerais, no período de 1980 a 2002 empregaram a SAM aplica ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos de bovinos. O isolado local estirpe Norma do sorovar Hardjo (Hardjoprajtino), foi introduzido na coleção de antígenos. As proporções de bovinos reatores para a estirpe Norma (23,7%) foram superiores as obtidas com a estirpe de referência Hardjo (Hardjoprajtino) (19,7%).

Oliveira (2005) comparou os resultados do teste de SAM efetuado com 22 estirpes de referência com os encontrados com o emprego de uma estirpe isolada da urina de cão em Londrina, Paraná, denominada Londrina 1 (LO1) tipificada por

[1] Centro de Controle de Zoonoses. Relatório de atividades do CCZ/Universidade Federal de Pelotas, ano de 2003, 151p., 2004

PFGE e VNTR como *L. interrogans* sorovar Canicola. Foram examinados 343 cães, sem vacinação, com suspeita de leptospirose. A inclusão da estirpe LO1 possibilitou a obtenção de resultados positivos em 5,88 % de animais considerados negativos com as estirpes de referência. Nos animais reagentes para mais do que um antígeno os títulos obtidos com a estirpe autóctone foram mais elevados.

Tocantins (2005) examinou 2.123 bovinos de 29 propriedades, do Estado de Mato Grosso, município de Cáceres. Encontrou 1.127 (57,93%) animais foram reatores para pelo menos uma sorovariedade de leptospira. Foram utilizadas 17 sorovariedades, incluindo a estirpe Norma. Houve 348 (30,85%) Hardjo (Hardjobovis), 337 (29,90%) de reatores Hardjoprajtino (Norma) e 212 (18,81%) Hardjoprajtino (OMS). Acréscimo de 125 animais reatores (11%) caracterizados como negativos com a estirpe de referência Hardjo (Hardjoprajitno) passaram a ser positivos com o emprego da estirpe autóctone.

Dias et al. (2007) empregaram o teste da SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. Os exames foram efetuados no período de janeiro a dezembro de 2006. De 382 bovinos examinados com duas estirpes isoladas locais, tipificadas por seqüenciamento do gene 16S rDNA e por VNTR, como *L. interrogans* sorovar Canicola estirpe Tande (JOUGLARD, 2005) e a outra tipificada por seqüenciamento do gene 16S rDNA como espécie *L. noguchi* estirpe Caco ÉD1 (SILVA, 2004, 2007), 147 (38,48%) foram reatores. Os sorovares prevalentes foram Hardjo (Hardjopratitno) (31,97%), *Leptonema Illini* (23,80%), sorovares Wolffi e Butembo cada um com 4,08%. Houve o acréscimo de dez bovinos (6,8%) caracterizados como reatores apenas com as estirpes isoladas locais.

Silva et al. (2009) efetuaram o teste da SAM em 22 capivaras abatidas em um frigorífico do município de Nova Bassano, no Rio Grande do Sul, Brasil utilizaram como antígenos 50 sorovares de leptospiras, um sorovar de *Leptonema* e três estirpes de leptospiras, isolados locais. Houve seis animais reatores, as reações predominantes foram para os antígenos do sorogrupo Australis incluindo uma estirpe local isolada de cão denominada estirpe Hook, da espécie *Leptospira noguchii.*

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Considerando a importância da leptospirose bovina e a necessidade do aprimoramento dos recursos diagnósticos atualmente disponíveis, os objetivos do presente trabalho foram.

3.1 Objetivo geral

Comparar o resultado obtido na SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose em bovinos, efetuada com a coleção de antígenos de referência e com a coleção de antígenos de referência acrescentada de antígenos constituídos por estirpes de leptospiras autóctones isoladas no Brasil de animais domésticos, silvestres e sinantrópicos.

3.2 Objetivos específicos

1) Comparar as proporções de bovinos de oito estados do Brasil identificados como reatores para a leptospirose pela SAM empregando a coleção de antígenos de referência e acrescidos de dez estirpes autóctones.
2) Comparar as proporções de rebanhos bovinos em oito estados do Brasil, com pelo menos um animal reator para a leptospirose, empregando a coleção de antígenos de referência e acrescidos de dez estirpes autóctones.
3) Verificar os sorovares de leptospira mais prováveis em rebanhos bovinos de oito Estados do Brasil, empregando a coleção de antígenos de referência e acrescidos de dez estirpes autóctones.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

A relação de materiais utilizados, critérios para amostragem, procedimentos e técnicas laboratoriais; descrição das estirpes de leptospiras isoladas (histórico e tipificação) e tratamento estatístico são relacionados a seguir.

4.1 Banco de Soros

O presente trabalho utilizou o banco de soros de bovinos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), representado por 9820 bovinos de 109 propriedades distribuídas por oito estados brasileiros: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo. Os soros foram colhidos no período de março de 2004 a maio de 2005.

Nos Apêndice A a H estão apresentadas as informações relativas aos municípios por estado em que foram colhidas amostras de sangue dos animais.

4.2 Critérios utilizados para escolha das propriedades, quantidade de propriedades e número de animais por propriedade.

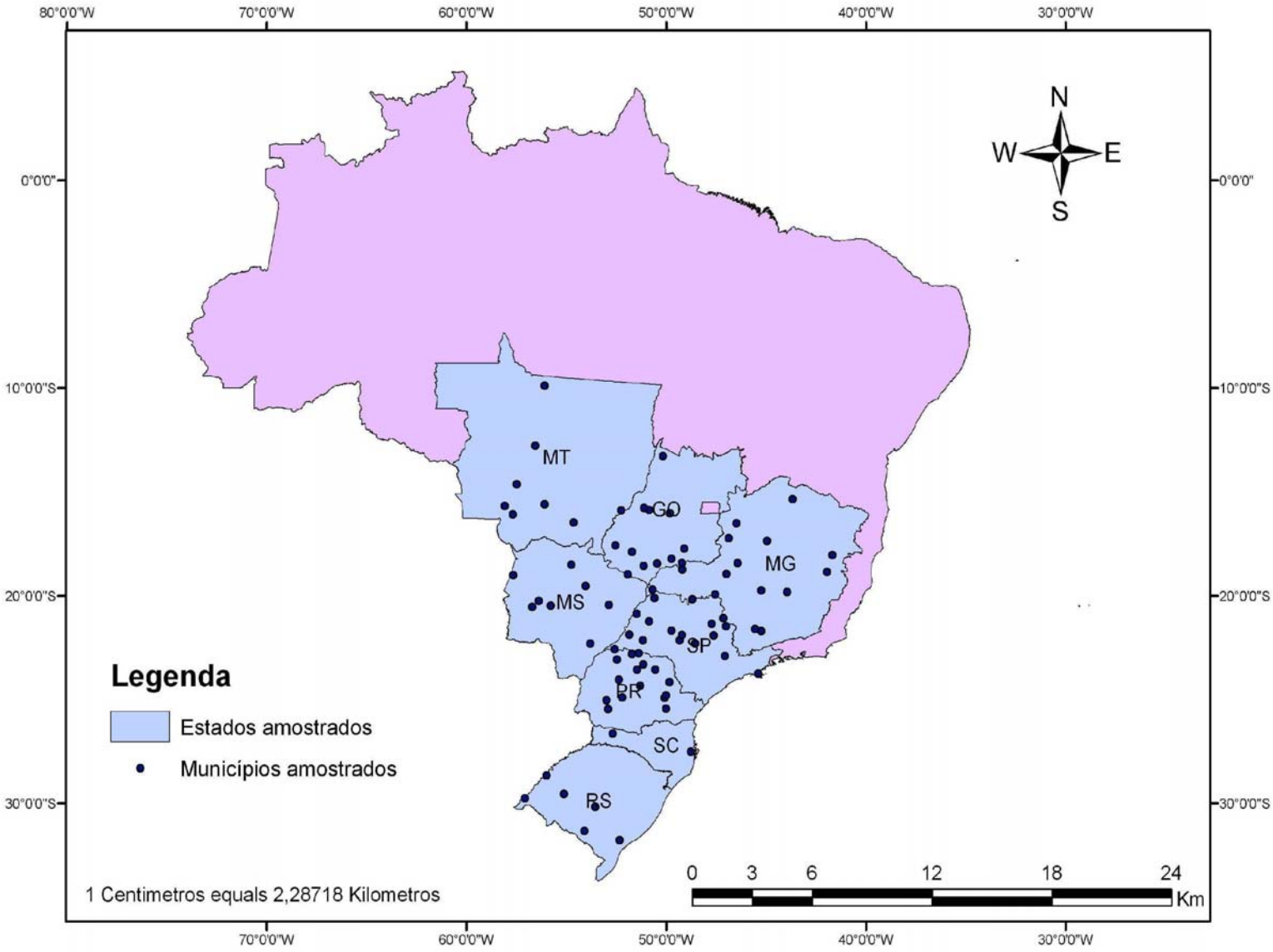
As 109 propriedades trabalhadas foram escolhidas por conveniência em estados brasileiros onde a atividade pecuária é expressiva, foram examinadas 20 propriedades por Estado em Goiás, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, no Mato Grosso onze propriedades, no Mato Grosso do Sul nove propriedades, no Rio Grande do Sul sete propriedades e em Santa Catarina duas propriedades. As propriedades foram distribuídas em 84 municípios descritos nos Apêndice A a H

A determinação do número de animais examinados por propriedade considerou o número de fêmeas em idade de procriar, com estimativa de prevalência de 4% e nível de confiança 99% (FAINE, 1982), Anexo A , tabela 1 e figura 1.

Tabela 1 - Bovinos, fêmeas em idade de procriar, submetidos ao inquérito sorológico para a leptospirose segundo código de identificação da propriedade, o número de animais examinados por propriedade e a sigla do estado correspondente. Colheitas efetuadas no período de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

Código da propriedade e *sigla do Estado do Brasil	Número de animais	Código da propriedade e *sigla do Estado do Brasil	Número de animais	Código da propriedade e *sigla do Estado do Brasil	Número de animais	Código da propriedade e *sigla do Estado do Brasil	Número de animais
1 - PR	109	29 - MG	57	57 - GO	112	85 - GO	56
2 - PR	107	30 - SP	109	58 - GO	63	86 - GO	58
3 - PR	108	31 - SP	58	59 - GO	63	87 - GO	114
4 - PR	108	32 - SP	57	60 - GO	119	88 - MT	108
5 - PR	107	33 - SP	109	61 - MG	58	89 - MT	108
6 - PR	108	34 - SP	108	62 - MG	107	90 - MT	108
7 - GO	114	35 - SP	108	63 - SP	58	91 - MT	108
8 - GO	114	36 - SP	110	64 - SP	107	92 - MT	107
9 - GO	59	37 - SP	108	65 - SP	58	93 - MT	107
10 - PR	107	38 - MG	57	66 - SP	107	94 - MT	108
11 - PR	106	39 - MG	56	67 - SP	58	95 - MG	113
12 - MG	102	40 - MG	118	68 - MS	111	96 - MG	109
13 - MG	62	41 - MG	58	69 - MS	110	97 - SC	108
14 - MG	109	42 - MG	59	70 - MS	112	98 - SP	58
15 - MS	119	43 - MG	57	71 - MS	109	99 - SP	58
16 - MG	101	44 - MG	59	72 - MS	110	100 - MT	108
17 - MG	106	45 - PR	57	73 - MS	120	101 - SC	109
18 - MT	108	46 - PR	58	74 - SP	106	102 - RS	108
19 - MT	107	47 - PR	58	75 - SP	108	103 - RS	107
20 - MT	109	48 - PR	58	76 - GO	60	104 - RS	109
21 - PR	109	49 - PR	58	77 - GO	58	105 - RS	107
22 - SP	59	50 - PR	58	78 - GO	57	106 - RS	108
23 - SP	58	51 - PR	58	79 - GO	68	107 - RS	100
24 - SP	61	52 - PR	57	80 - GO	110	108 - RS	109
25 - MG	105	53 - PR	58	81 - GO	114	109 - GO	61
26 - MS	94	54 - PR	108	82 - GO	113	.....	.....
27 - MS	110	55 - PR	58	83 - GO	118	.....	.....
28 - MG	59	56 - MG	63	84 - GO	61	.....	.....

*** PR = Paraná; GO= Goiás; MT=Mato Grosso; MS=Mato Grosso do Sul; MG= Minas Gerais; SC=Santa Catarina; SP= São Paulo; RS= Rio Grande do Sul.**



GO= Goiás; **MT**= Mato Grosso; **MS**= Mato Grosso do Sul; **MG**= Minas Gerais; **PR**= Paraná, **SC**= Santa Catarina, **SP**= São Paulo, **RS**= Rio Grande do Sul

Figura 1 - Mapa do Brasil, representando os oito estados amostrados, as siglas nacionais correspondentes e a localização geográfica dos 84 municípios amostrados. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 -São Paulo -2009

4.3 Prova de Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos aplicada ao diagnóstico da leptospirose

Os antígenos foram culturas vivas de estirpes de leptospiras, mantidas por repiques semanais em meio de Ellinghausen McCullough - Jonhson – Harris (EMJH) (Difco-USA) modificado, suplementado com 15% de soro estéril de coelho enriquecido com 1% de piruvato de sódio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio a 1% e 3% L-asparagina, 0,20 g de peptona e 0,30 g de extrato de carne (TURNER, 1970; ALVES, 1996). A inativação do sistema complemento do soro de coelho foi efetuada por tratamento térmico a 56°C por 30 minutos. As culturas foram incubadas durante sete a dez dias em estufa a 28 °C a 30° C.

A coleção de antígenos empregada na técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) foi representada por 23 sorovares de estirpes de leptospiras de referência, Quadro 1 e dez estirpes autóctones isoladas de animais no Brasil, tipificadas por Mab, PFGE, seqüenciamento do gene 16S rDNA, VNTR, Quadro 2.

Os soros de bovinos foram armazenados em frascos do tipo "*eppendorf*", conservados a – 20° C. No momento do exame, os soros foram descongelados e submetidos à microtécnica de soroaglutinação microscópica (COLE JR, 1973; GALTON et al., 1965).

4.4 Triagem

As amostras que não continham 100 µl de soro foram descartadas e consideradas como insuficientes. As amostras de soro com quantidade suficiente para o exame foram diluídas a 1:50 em solução de salina de Sörensen e distribuídas em microplaca de poliestireno de fundo chato. A seguir, foi acrescentado 50µl do antígeno correspondente, obtendo-se a diluição final de 1:100. As microplacas foram agitadas e incubadas a 28 °C por três horas (SANTA ROSA, 1970).

4.5 Titulação

Os soros reagentes na triagem foram novamente testados para a determinação do título final de aglutininas antileptospiras, efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica na razão de dois em solução salina tamponada de Sorensen e acrescida de 50 µl de antígeno que reagiu como positivo no teste de triagem. As microplacas foram incubadas a 28 °C por três horas.

4.6 Leitura e interpretação

As leituras foram realizadas em microscópio óptico Jena Zeiss do Brasil com condensador de campo escuro seco, com lente objetiva 10 X 0,20 e ocular 10 (100X). O grau para a avaliação das aglutinações seguiu os critérios da Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde, Brasil (BRASIL, 1995, FAINE et al, 1999). O título considerado foi a recíproca da maior diluição que apresentou 50% de leptospiras aglutinadas por campo microscópico (FAINE et al., 1999).

O sorovar mais provável foi o que apresentou maior título. Quando um animal apresentou título mais elevado idêntico para dois ou mais sorovares o mesmo foi descartado desta análise (VASCONCELLOS et al., 1997). O resultado da SAM foi inserido em um banco de dados com o emprego do software Microsoft Acess®

Sorogrupo	Variante sorológica	Estirpe	Instituição de origem*
Australis	Australis	Ballico	1
Australis	Bratislava	Jez Bratislava	2
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	1
Autumnalis	Butembo	Butembo	1
Ballum	Castellonis	Castellon 3	1
Bataviae	Bataviae	Swart	1
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	1
Celledoni	Whitcombi	Whitcombi	1
Cynopteri	Cynopteri	3522 C	1
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	1
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	1
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20	1
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	1
Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46	1
Panama	Panama	CZ 214 K	1
Pomona	Pomona	Pomona	1
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	1
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno	2
Sejroe	Wolffi	3705	2
Shermani	Shermani	1342 K	1
Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	1
Seramanga	Patoc	Patoc 1	1
Djasiman	Sentot	Sentot	1

*1 CDC – EUA /Prof. Dr. Paulo Hideki Yasuda
2 BgVV – Berlim Alemanha (Arno Schönberg)

Quadro 1 - Coleção de antígenos de leptospiras de referência empregada na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo sorogrupo, sorovar, estirpe e instituição de origem - São Paulo - 2009

espécie de origem	estirpe	* anticorpos monoclonais	** PFGE	*** seqüenciamento gene 16S rDNA	VNTR4	VNTR7	VNTR9	VNTR10	VNTR11	VNTR19	VNTR23	*** VNTR	**** MLST
Didelphis marsupialis (gambá)	AN776	sorogrupo Bataviae sorovar Brasiliensis	novo no banco de dados	*Leptospira santarosai*	-	-	-	-	-	-	-	...	...
Sus scrofa domestica (suíno)	M7/87	sorogrupo Pomona sorovar Pomona	Kennewicki	*Leptospira interrogans*	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genótipo A)	...
Bubalus bubalis (bubalino)	M4/98	sorogrupo Sejroe sorovar Guaricura	novo no banco de dados	*Leptospira santarosai*	-	-	-	-	-	-	-	...	sorogrupo Sejroe sorovar Guaricura
Rattus norvegicus (murino)	M9/99	sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	*Leptospira interrogans*	2	1	13	7	1	2	0	Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni	sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni
Canis familiaris (canino)	LO1	...	Canicola	*Leptospira interrogans*	1	10	2	3	2	10	2	Canicola	...
Sus scrofa domestica (suíno)	LO4	sorogrupo Canicola sorovar Canicola	Canicola	*Leptospira interrogans*	1	10	2	3	2	10	2	Canicola	...
Bos taurus (bovino)	LO14	sorogrupo Canicola sorovar Canicola	Canicola	*Leptospira interrogans*	1	10	2	3	2	10	2	Canicola	sorogrupo Canicola sorovar Canicola
Hydrochaeris hydrocharis (capivara)	2A CAP	sorogrupo Grippotyphosa sorovar Bananal	padrão desconhecido 2	*Leptospira santarosai*	-	-	-	-	-	-	-	...	sorogrupo Grippotyphosa sorovar Bananal
Hydrochaeris hydrochaeris (capivara)	21 CAP	sorogrupo Grippotyphosa sorovar Bananal	padrão desconhecido 2	*Leptospira santarosai*	-	-	-	-	-	-	-	...	...
Sus scrofa domestica (suíno)	GR6	...	...	*Leptospira interrogans*	4	1	6	10	2	8	2	Pomona (genótipo A)	...

*Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda
**Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, Estados Unidos da América (EUA)
***Centro de Biotecnologia /Laboratório de Biologia Molecular/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil
... Resultados não disponíveis

PFGE = Pulsed Field Gel Eletrophoresis
gene 16 S rDNA= gene que codifica região 16S do RNA ribossômico
VNTR= Variable Number of Tandem Repeats
MLST= Multilocus Sequence Typing

Quadro 2 - Estirpes de leptospiras autóctones isoladas no Brasil e tipificadas pelas técnicas de anticorpos monoclonais, PFGE, seqüenciamento do gene 16S rDNA, VNTR, MSLT, segundo a espécie, animal de origem, código de identificação, técnica empregada e o respectivo resultado - São Paulo - 2009

4.7 Histórico das estirpes de leptospiras isoladas no Brasil empregadas no teste de SAM para o diagnóstico de leptospirose bovina

AN776

Espécie: *Leptospira santarosai*
Sorogrupo: Bataviae
Sorovar: Brasiliensis
Ano: 1961
Origem: gambá de orelha preta (*Didelphis marsupialis*)

Estirpe AN 776, isolada pelo Instituto Biológico de São Paulo, em 1961 por Santa Rosa et al. (1972) do rim de um marsupial (*Didelphis marsupialis*) capturado em áreas próximas a cidade de São Paulo, SP, Brasil foi tipificada pela técnica de aglutinação cruzada, como do sorogrupo Bataviae e pela absorção de aglutininas como um novo sorovar denominado de Brasiliensis.

M7/87

Espécie: *Leptospira interrogans*
Sorogrupo: Pomona
Sorovar: Pomona
Ano: 1987
Origem: Suíno (*Sus scrofa domestica*)

A estirpe M7/87 foi isolada pelo LZB do VPS FMVZ/USP, do rim de um suíno abatido em Frigorífico do município de Carapicuíba, SP. Esta estirpe foi tipificada como Kennewicki, pelo Center of Disease Control (CDC), Atlanta, EUA, pela técnica de PFGE, também foi enviada para o Royal Tropical Institute de Amsterdam, Holanda, onde foi tipificada por painel de anticorpos monoclonais como sorogrupo Pomona, sorovar Pomona e pelo laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Rio Grande do Sul (RS), Brasil, onde a espécie *L. interrogans* foi identificada pelo seqüenciamento do gene

16S rDNA e a identidade do sorogrupo e sorovar Pomona foi confirmada pela técnica de VNTR com o resultado de VNTR4 (4), VNTR7 (1), VNTR9 (6), VNTR10 (10), VNTR 11 (2), VNTR19 (8), VNTR23 (2) (JOUGLARD,

M4/98

Espécie: *Leptospira santarosai*
Sorogrupo: Sejroe
Sorovar: Guaricura
Ano: 1998
Origem: Bubalino (*Bubalus bubalis*)

A estirpe M4/98 foi isolada pelo LZB, VPS, FMVZ/USP, da cultura dos rins de hamsters adultos jovens, inoculados com urina colhida de búfalas em maio de 1998, em uma fazenda localizada em Registro, Vale do Ribeira, São Paulo, SP. A tipificação da espécie foi efetuada pelo Laboratório de Biologia Molecular, do Centro de Biotecnologia, da UFPel, RS, Brasil, pelo seqüenciamento do gene 16 S rDNA como *Leptospira santarosai.* No Laboratório de Zoonoses Bacterianas/VPS/FMVZ/USP, foi utilizado o teste de aglutinação cruzada com anti-soros policlonais (SANTA ROSA,1970) como sendo do sorogrupo Sejroe. O laboratório de referência da OMS, Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda classificou a estirpe como do sorovar Guaricura com o emprego de painel de anticorpos monoclonais (VASCONCELLOS et al., 2001).

M9/99

Espécie: *Leptospira interrogans*
Sorogrupo: Icterohaemorrhagiae
Sorovar: Copenhageni
Ano: 1999
Origem: Ratazana (*Rattus norvegicus*)

A estirpe M9/99, isolada pelo LBZ, VPS, FMVZ/USP do tecido renal de *Rattus norvegicus* (ratazana) capturado em novembro do ano 1999, na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZ-SP) foi tipificada pelo Laboratório de Biologia Molecular, do Centro de Biotecnologia – UFPel/RS, Brasil, como espécie *L. interrogans* por seqüenciamento do gene 16 S rDNA. No Royal Tropical Institute, de Amsterdan, Holanda, a tipificação foi efetuada por painel de anticorpos monoclonais, caracterizando a estirpe como sorovar Copenhageni semelhante à estirpe de referência M20 (CORREA et al., 2004, FAGUNDES et al., 2008).

LO1

Espécie: *Leptospira interrogans*
Sorogrupo: Canicola
Sorovar: Canicola
Ano: 2000
Origem: *Canis familiaris*

A estirpe LO1 foi isolada pelo Laboratório de Leptospirose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FMVZ/ Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná (PR), Brasil, da urina de um cão, macho, sem raça definida, com três anos de idade, nunca vacinado para leptospirose, atendido no Hospital Veterinário da UEL. No Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, EUA, a estirpe foi submetida a eletroforese de campo pulsado e identificada como sendo do sorovar Canicola. No Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFPel, RS, Brasil, a estirpe foi analisada ao seqüenciamento do gene 16S rDNA e identificada como *L. interrogans* e por VNTR: VNTR4(1), VNTR7(10), VNTR9(2), VNTR10(3), VNTR11(2), VNTR19 (10), VNTR23 (2) foi classificada como do sorogrupo Canicola e sorovar Canicola (OLIVEIRA et al., 2005; FAGUNDES et al., 2008).

LO4

Espécie: *Leptospira interrogans*
Sorogrupo: Canicola
Sorovar: Canicola
Ano: 2000
Origem: suíno (*Sus scrofa domestica)*

A estirpe LO4 foi isolada pelo Laboratório de Leptospirose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FMVZ/ UEL, PR, Brasil, do fígado de um suíno abatido, no Estado do Paraná, Brasil. O Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFPel, RS, Brasil tipificou esta estirpe como *L. interrogans* pelo seqüenciamento do gene 16 S rDNA. No Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda a estirpe foi identificada por painel de anticorpos monoclonais e no CDC, Atlanta, EUA por eletroforese de campo pulsado, e no Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFPel, RS, Brasil, pela técnica de VNTR, com o resultado de VNTR4(1), VNTR7(10), VNTR9(2), VNTR10(3), VNTR11(2), VNTR19(10), VNTR23(2). Os resultados obtidos confirmaram sorogrupo Canicola, sorovar Canicola (DELBEM et al., 2002; FREITAS et al., 2004; FAGUNDES et al., 2008).

LO14

Espécie: *Leptospira interrogans*
Sorogrupo: Canicola
Sorovar: Canicola
Ano: 2001
Origem: Bovino (*Bos taurus*)

A estirpe L014 foi isolada pelo Laboratório de Leptospirose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da UEL, PR, da urina de um bovino abatido no Estado do Paraná. A tipificação foi efetuada pelo Royal Tropical Institute, Amsterdam, na Holanda por um painel de 43 anti-soros policlonais e por painel de anticorpos monoclonais, identificou a estirpe como sendo, respectivamente, do sorogrupo Canicola e o sorovar Canicola. No CDC, Atlanta, USA, a estirpe foi classificada como sorovar Canicola, pela técnica do PFGE. No Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFPel, RS, Brasil, a estirpe foi tipificada como espécie *L. interrogans* e sorovar Canicola, respectivamente pelas técnicas do seqüenciamento do gene 16 S rDNA e VNTR. Os locus identificados pelo VNTR foram VNTR4(1), VNTR7(10), VNTR9(2), VNTR10(3), VNTR11(2), VNTR19(10), VNTR23(2) (ZACARIAS et al., 2008).

2ACAP e 21 CAP

Espécie: *Leptospira santarosai*
Sorogrupo: Grippotyphosa
Sorovar: Bananal
Ano: 2001
Origem: Capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*)

As estirpes 2ACAP e 21 CAP foram isoladas pelo LBZ, VPS, FMVZ/USP, do rim de capivaras abatidas no município de Piracicaba, SP, no ano de 2001. O Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia, UFPel, RS, Brasil, identificou a espécie como *L. santarosai* por seqüenciamento do gene 16 S rDNA. O Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP/VPS, pelo teste de aglutinação cruzada com anti-soros policlonais produzidos no próprio laboratório (Santa Rosa, 1970) identificou a estirpe como sendo do sorogrupo Grippotyphosa. No Royal Tropical Institute de Amsterdam, Holanda, a estirpe foi identificada por um painel de anticorpos monoclonais, como sendo do sorovar Bananal (MARVULO et al., 2002).

GR6

Espécie: *Leptospira interrogans*
Sorogrupo: Pomona
Sorovar: Pomona
Ano: 2003
Origem: Suíno (*Sus scrofa domestica*)

A estirpe GR6 foi isolada pelo LZB, VPS, FMVZ/USP, do rim de um suíno (marrã) abatido, no município de Suzano, SP, 2003. O Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia, da UFPel,RS, Brasil, tipificou a estirpe por seqüenciamento do gene 16 S rDNA , e a classificou como da espécie *L. interrogans* e pela técnica de VNTR obteve o resultado: VNTR4 (4), VNTR7 (1), VNTR9 (6), VNTR10 (10), VNTR11 (2), VNTR19 (8), VNTR23 (2) que identificou a estirpe como do sorogrupo Pomona, sorovar Pomona (MIRAGLIA et al., 2008).

4.8 Análise estatística

A análise dos resultados foi efetuada com o programa estatístico for Windows SPSS versão13.0.

4.8.1 Estatística descritiva

As freqüências por estado, para qualquer sorovar, identificação do sorovar mais provável por propriedade e por estado foram apresentadas em tabelas e gráficos pelo programa Windows Excell® 2007 e os mapas pelo programa de sistema de informação geográfica ArcGIS, versão 9.2

4.8.2 Inferência estatística

Teste de McNemar com nível de significância de 0,05.(SIEGEL, 1981) Anexo B

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Dos 9820 bovinos, fêmeas em idade de procriar examinados, 5806 (59,12%) foram reagentes na SAM para qualquer sorovar com a coleção de 23 sorovares de referência com títulos variando de 100 a 12800. Com a coleção de antígenos, constituídos por 23 sorovares de referência e dez estirpes autóctones houve 6400 (65,17%) reagentes com títulos variando de 100 a 12800, portanto a coleção de antígenos ampliada propiciou um aumento de 594 animais (6,00 %) classificados como não reagentes pela coleção de referência. Das 109 propriedades trabalhadas, 106 foram consideradas positivas com pelo menos um animal reagente na SAM para leptospirose. Não houve diferença no número de propriedades com pelo menos um animal reator para leptospirose, segundo a coleção de antígenos empregada. Os resultados obtidos são apresentados por estado na tabela 2.

Tabela 2 - Bovinos fêmeas em idade de procriar, submetidos ao teste de soroaglutinação microscópica aplicado ao diagnóstico da leptospirose com uma coleção de 23 sorovares de referência e com a coleção de 23 sorovares de referência acrescida de dez estirpes autóctones, segundo o estado de origem e a natureza do resultado obtido para qualquer sorovar - São Paulo - 2009

Estado	**Coleção 23 antígenos de referência**		**Coleção 23 antígenos de referência e dez autóctones**		****p*-valor**
	Proporção	%	Proporção	%	
Goiás	*1102/1741	63,30	1203/1741	69,10	0,001
Mato Grosso	743/1186	62,65	895/1186	75,46	0,004
Mato Grosso do Sul	740/995	74,37	812/995	81,61	0,000
Minas Gerais	986/1615	61,05	1073/1615	66,44	0,001
Paraná	681/1655	41,15	723/1655	43,69	0,000
Rio Grande do Sul	378/748	50,53	387/748	51,74	0,000
São Paulo	1005/1663	60,43	1135/1663	68,25	0,001
Santa Catarina	171/217	78,80	172/217	79,26	0,522
TOTAL	5806/9820	59,12	6400/9820	65,17	0,001

*= Proporção do número de animais reagentes para qualquer sorovar de *Leptospira spp*, sobre o número de animais examinados.
**= *p,* probabilidade associada a hipótese de nulidade – Teste de McNemar

As proporções de animais reatores para leptospirose por estado com a coleção de 23 antígenos de referência variaram de 41,15 a 78,80 % e com a coleção de 23 antígenos de referência acrescida de dez estirpes autóctones variaram de 43,69 a 79,26%, tabela 2 e figuras 2 e 3. A proporção de valores em todos os estados com a coleção de 23 sorovares de referência foi de 59,12 e na coleção de 23 sorovares de referência acrescida de dez estirpes autóctones foi de 65,17. Esta diferença foi significante (p=0,001), tabela 2. O único Estado em que não houve diferença significante foi o de Santa Catarina (p=0,522).

Das 109 propriedades trabalhadas, os resultados obtidos com a coleção de 23 sorovares de referência identificaram o sorovar Hardjo como o mais provável em 60 propriedades (55,05%) e o sorovar Shermani em 14 (12,84%). Com a coleção de antígenos ampliada por dez estirpes autóctones isoladas no Brasil, o sorovar Hardjo foi o mais provável em 44 propriedades (40,37%) e o Guaricura em 27 (24,77%), em duas propriedades houve a associação Hardjo e Guaricura, quadro 3.

Dos 9820 animais examinados, descontadas as reações empatadas para dois ou mais sorovares, foram aproveitadas 3876 reações obtidas com a coleção de 23 antigenos de referência e 4388 com a coleção ampliada pelos antígenos de estirpes autóctones. Os cinco sorovares mais prováveis identificados por animal examinado com a coleção de 23 sorovares de referência foram em ordem decrescente de ocorrência: Hardjo (43,03 %), Shermani (20 %), Wolffi (9,96%), Grippothyphosa (5,42%) e Pomona (4,28%). Com a coleção ampliada por dez estirpes isoladas no Brasil, os cinco sorovares mais prováveis foram Hardjo (31,00%), Guaricura - M4/84 (22,50%), Shermani (15,43%), Wolffi (4,76%), Grippothyphosa (3,71%) e Autumnalis (3,24%) tabela 3 e gráficos 1 e 2.

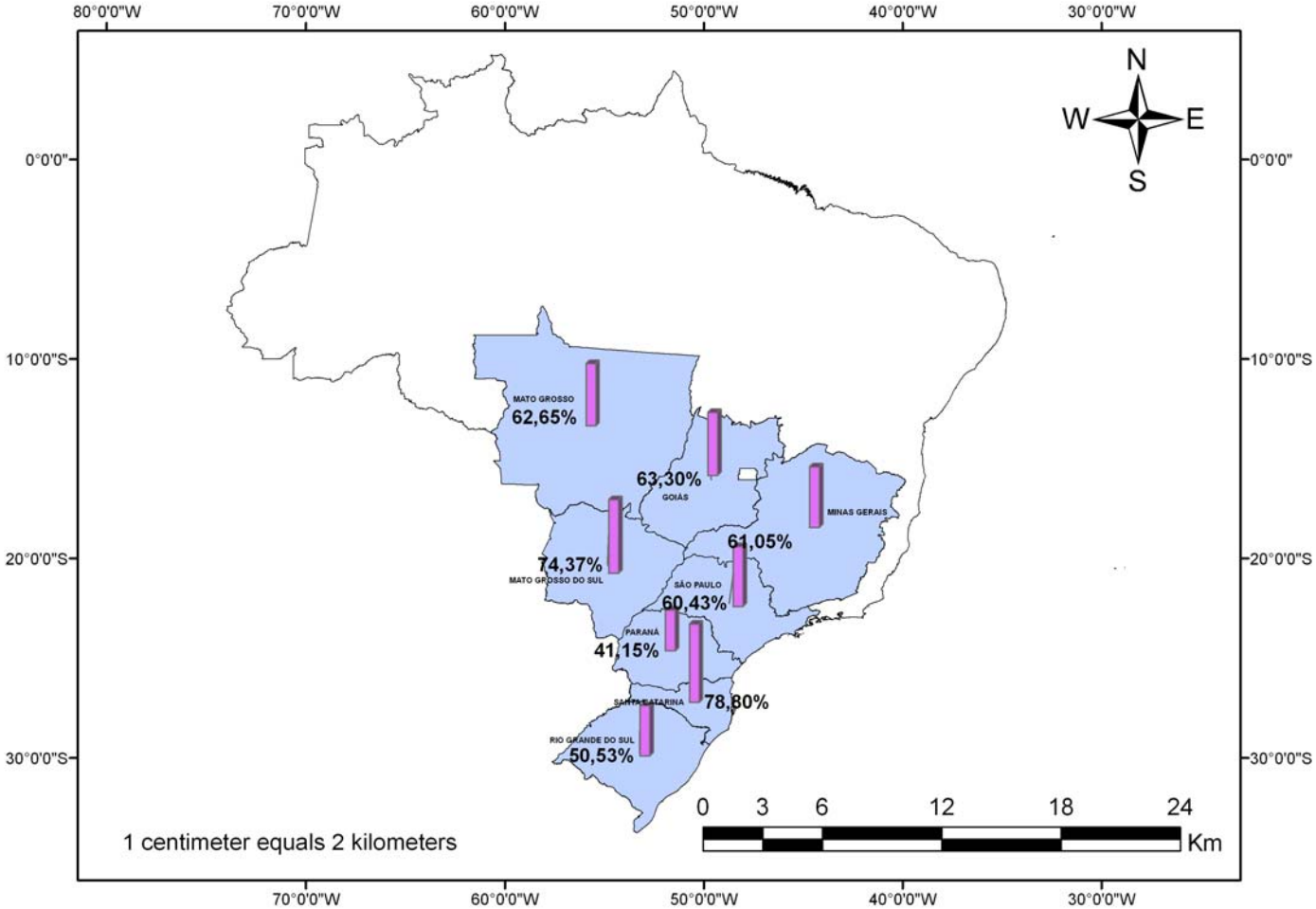


Figura 2 - Mapa do Brasil, representando os oito estados amostrados e a proporção de bovinos sororeagentes a microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM) para leptospirose com a coleção de 23 antígenos de referência, pelo total de bovinos examinados por estado - São Paulo - 2009.

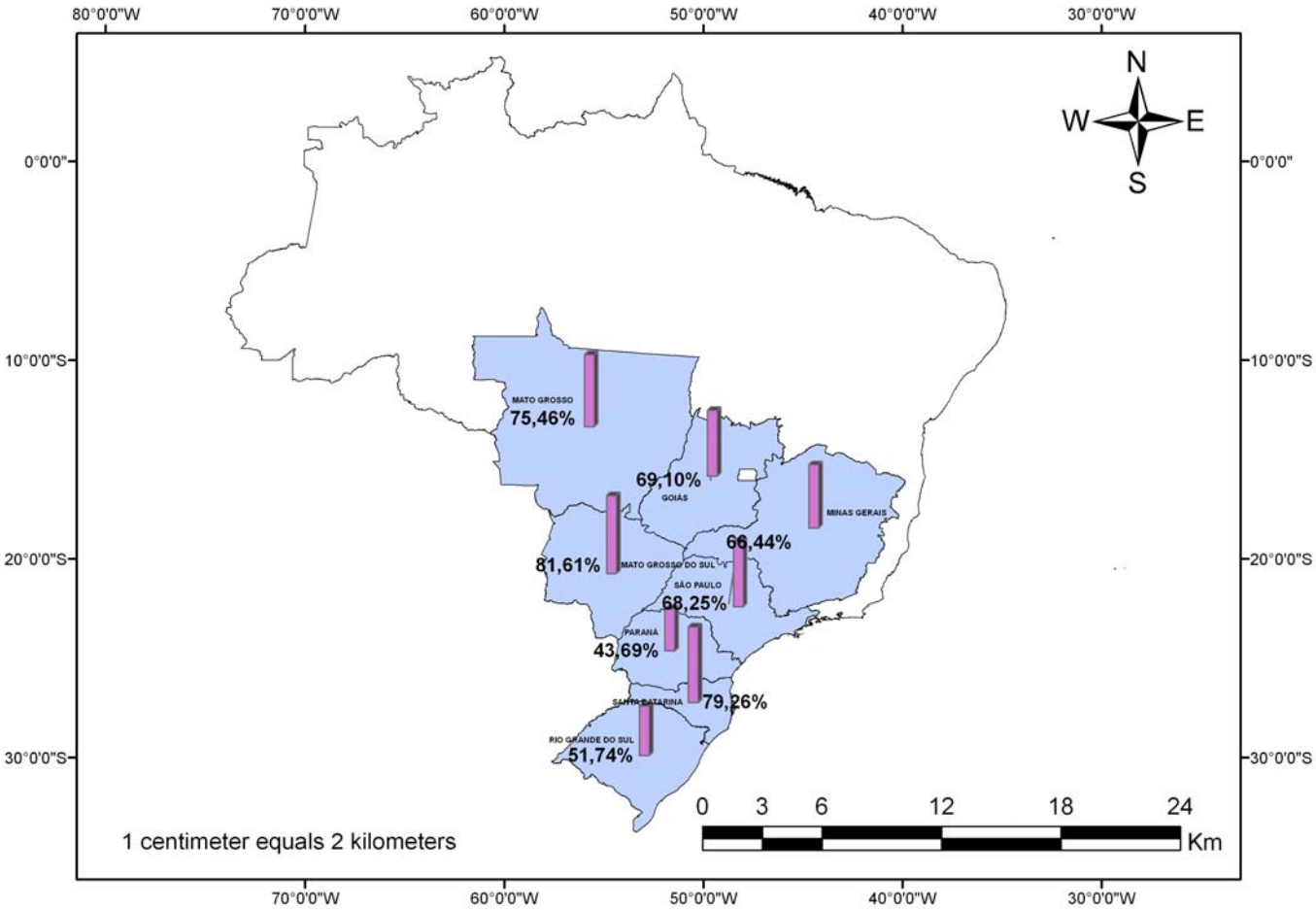


Figura 3 - Mapa do Brasil, representando os oito estados amostrados e a proporção de bovinos sororeagentes na microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM) para leptospirose com a coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes autóctones, pelo total de bovinos examinados por estado - São Paulo - 2009.

Identificação da propriedade *sigla do Estado do Brasil	Coleção de 23 antígenos de referência	Coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes autóctones	Identificação da propriedade *sigla do Estado do Brasil	Coleção de 23 antígenos de referência	Coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes autóctones
1 - PR	Bratislava	Bratislava	29 - MG	Hardjo	Hardjo
2 - PR	Hardjo	Hardjo	30 - SP	Hardjo	Hardjo
3 - PR	Autumnalis	Autumnalis	31 - SP	Hardjo	Hardjo
4 - PR	Hardjo	Hardjo	32 - SP	Hardjo	Hardjo
5 - PR	Shermani	Hardjo e Shermani	33 - SP	Hardjo	Hardjo
6 - PR	Shermani	Shermani	34 - SP	Pomona	Guaricura
7 - GO	Hardjo	Hardjo	35 - SP	Hardjo	Guaricura
8 - GO	Hardjo	Canicola (LO14)	36 - SP	Hardjo	Hardjo
9 - GO	Hardjo	Hardjo	37 - SP	Hardjo	Hardjo
10 - PR	Hardjo	Hardjo	38 - MG	Grippothyphosa	Pomona(M7/87)/Grippothyphosa
11 - PR	Shermani	Shermani	39 - MG	Shermani	Shermani
12 - MG	Hardjo	Guaricura	40 - MG	Hardjo	Hardjo
13 - MG	Hardjo	Guaricura	41 - MG	Hardjo	Hardjo
14 - MG	Hardjo	Hardjo e Guaricura	42 - MG	Hardjo	Hardjo
15 - MS	Hardjo	Guaricura	43 - MG	Hardjo	Hardjo
16 - MG	Wolffi/Shermani	Shermani	44 - MG	Shermani	Shermani
17 - MG	Hardjo	Hardjo	45 - PR	Autumnalis/Grippotyphosa/ Castellonis/Shermani	Autumnalis/Grippotyphosa Castellonis/ Shermani
18 - MT	Wolffi	Guaricura	46 - PR	Autumnalis/Grippotyphosa	Autumnalis
19 - MT	Hardjo	Hardjo	47 - PR	Hardjo e Pomona	Hardjo
20 - MT	Hardjo	Guaricura	48 - PR	Hardjo	Hardjo
21 - PR	Hardjo	Hardjo	49 - PR	Pomona	Hardjo
22 - SP	Shermani	Shermani	50 - PR	Negativo	Negativo
23 - SP	Hardjo/ Shermani	Guaricura	51 - PR	Grippotyphosa	Pomona (M7/87)/Grippothyphosa
24 - SP	Hardjo/Shermani/Icterohaemorrhagia e Patoc	Hardjo/Shermani Icterohaemorrhagiae/Patoc	52 - PR	Negativo	Negativo
25 - MG	Grippothyphosa	Grippothyphosa	53 - PR	Negativo	Negativo
26 - MS	Hardjo	Hardjo	54- PR	Hardjo	Guaricura
27 - MS	Wolffi	Guaricura	55 - PR	Shermani	Shermani
28 - MG	Shermani	Shermani	...	...	...

Quadro 3 - Sorovar de leptospira mais provável identificado em bovinos submetidos ao teste de SAM, com a coleção de 23 antígenos de referência e coleção ampliada por dez estirpes autóctones isoladas no Brasil, segundo o número de identificação da propriedade. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo – 2009 (continua)

Identificação da propriedade *sigla do Estado do Brasil	Coleção de 23 antígenos de referência	Coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes autóctones	Identificação da propriedade *sigla do Estado do Brasil	Coleção de 23 antígenos de referência	Coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes autóctones
56 - MG	Shermani	Shermani	83 - GO	Hardjo	Hardjo
57 - GO	Hardjo	Hardjo	84 - GO	Hardjo	Hardjo
58 - GO	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	85 - GO	Hardjo	Hardjo
59 - GO	Hardjo	Hardjo	86 - GO	Hardjo	Hardjo
60 -GO	Hardjo	Hardjo	87 - GO	Hardjo	Guaricura
61 - MG	Hardjo	Hardjo	88 - MT	Wolffi	Wolffi
62 - MG	Hardjo	Hardjo	89 - MT	Hardjo	Guaricura
63 - SP	Hardjo	Hardjo	90 - MT	Wolffi	Guaricura
64 - SP	Hardjo	Hardjo	91 - MT	Shermani	Guaricura
65 - SP	Hardjo	Hardjo	92 - MT	Pomona	Guaricura
66 - SP	Hardjo	Hardjo	93 - MT	Shermani	Guaricura
67 - SP	Australis	Australis	94 - MT	Shermani	Guaricura
68 - MS	Hardjo	Guaricura	95 - MG	Hardjo	Guaricura
69 - MS	Hardjo	Hardjo	96 - MG	Hardjo	Guaricura
70 - MS	Hardjo	Hardjo	97 - SC	Hardjo	Pomona
71 - MS	Hardjo	Guaricura	98 - SP	Hardjo	Hardjo
72 - MS	Shermani	Guaricura	99 - SP	Hardjo	Hardjo
73 - MS	Wolffi	Guaricura	100 - MT	Autumnalis / Hardjo	Autumnalis
74 - SP	Wolffi	Guaricura	101 - SC	Hardjo	Hardjo
75 - SP	Bratislava/Wolffi/Shermani	Guaricura	102 - RS	Hardjo	Hardjo
76 - GO	Shermani	Shermani	103 - RS	Castellonis	Castellonis
77 - GO	Canicola	Canicola (LO14)	104 - RS	Hardjo	Hardjo
78 - GO	Pomona	Guaricura	105 - RS	Hardjo	Australis
79 - GO	Pomona	Pomona,Wolffi e Canicola (LO4)	106 - RS	Pomona	Pomona
80 - GO	Wolffi	Shermani	107 - RS	Hardjo	Hardjo/Guaricura
81 - GO	Wolffi	Guaricura	108 - RS	Hardjo	Bratislava
82 - GO	Hardjo	Hardjo	109 - GO	Pomona/Grippothyphosa/Hardjo	Pomona/Grippothyphosa/Hardjo
* PR = Paraná; GO= Goiás; MG= Minas Gerais; MT= Mato Grosso; MS= Mato Grosso do Sul; SC= Santa Catarina; SP= São Paulo; RS= Rio Grande do Sul SAM = microtécnica de soroaglutinação microscópica					

Quadro 3 - Sorovar de leptospira mais provável identificado em bovinos submetidos ao teste de SAM, com a coleção de 23 antígenos de referência e coleção ampliada por dez estirpes autóctones isoladas no Brasil, segundo o número de identificação da propriedade. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009 (conclusão)

Tabela 3 - Sorovar de leptospira mais provável identificado em inquérito sorológico efetuado pelo teste da SAM de 109 propriedades distribuídas em oito estados brasileiros segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005. São Paulo, 2009.

Sorovar	Coleção 23 antígenos de referência		Coleção 23 antígenos de referência e dez autóctones	
	Proporção	%	Proporção	%
Australis	*102/3876	2,63	*100/4388	2,28
Bratislava	78/3876	2,01	70/4388	1,60
Autumnalis	161/3876	4,15	142/4388	3,24
Butembo	17/3876	0,44	15/4388	0,34
Castellonis	36/3876	0,93	32/4388	0,73
Bataviae	1/3876	0,03	1/4388	0,02
Canicola	23/3876	0,59	6/4388	0,14
Witcombi	16/3876	0,41	14/4388	0,32
Gripotyphosa	210/3876	5,42	163/4388	3,71
Hebdomadis	62/3876	1,60	39/4388	0,89
Copenhageni	14/3876	0,36	11/4388	0,25
Icterohaemorrhagiae	47/3876	1,21	35/4388	0,80
Panamá	8/3876	0,21	8/4388	0,18
Pomona	166/3876	4,28	105/4388	2,39
Pyrogenes	75/3876	1,94	59/4388	1,34
Hardjo	1668/3876	43,03	1360/4388	31,00
Wolffi	386/3876	9,96	209/4388	4,76
Shermani	775/3876	20,00	677/4388	15,43
Tarassovi	24/3876	0,62	23/4388	0,52
Patoc	7/3876	0,18	5/4388	0,11
Grippotyphosa (2ACAP)	...	...	14/4385	0,32
Grippotyphosa (21CAP)	...	...	19/4388	0,43
Brasiliensis	...	...	1/4388	0,02
Pomona (GR6)	...	...	14/4388	0,32
Canicola (LO1)	...	...	21/4388	0,48
Canicola (LO4)	...	...	43/4388	0,98
Canicola (LO14)	...	...	122/4388	2,78
Guaricura	...	...	986/4388	22,50
Pomona (M7/87)	...	...	81/4388	1,85
Copenhageni (M9/99)	...	...	13/4388	0,30
Total	3876/3876	100	4388/4388	100

*Número de animais reatores com títulos mais elevados para o sorovar sobre o número de animais em que houve reação com título mais elevado para um sorovar. Os animais em que houve título mais elevado idêntico para dois ou mais sorovares foram eliminados desta análise.

... Resultados não disponíveis

SAM = microtécnica de soroaglutinação microscópica

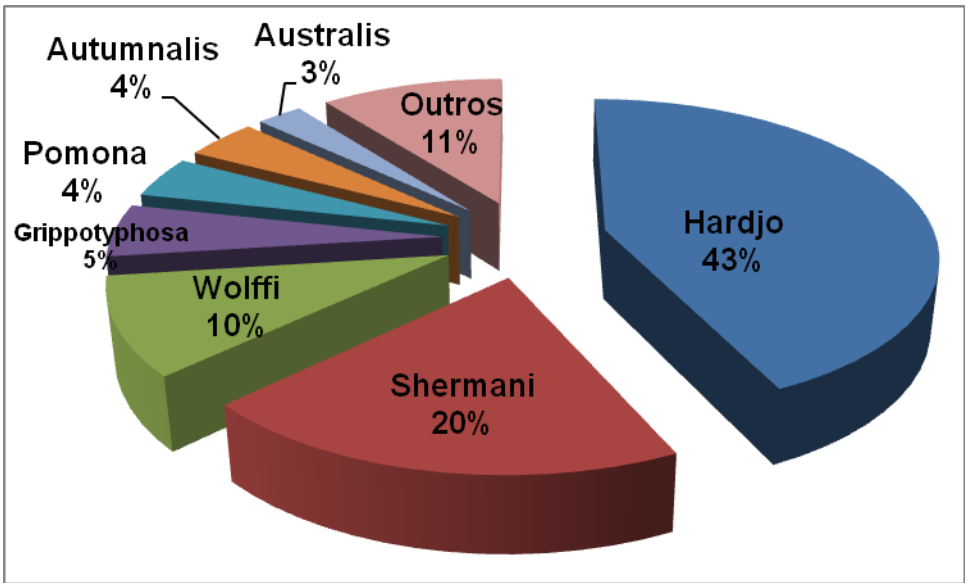


Gráfico 1 - Proporção de sorovares de *Leptospiras spp* mais prováveis em bovinos fêmeas de oito estados do Brasil, identificados pela microtécnica de aglutinação microscópica (SAM) com a coleção de **23 antígenos de referência**. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009.

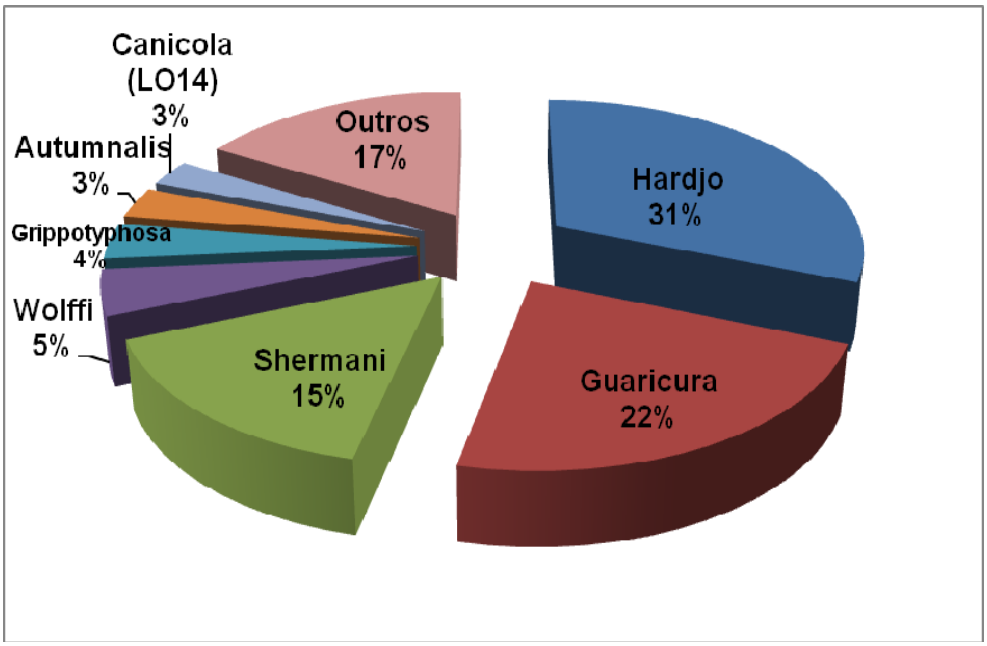


Gráfico 2 - Proporção de sorovares de *Leptospiras spp* mais prováveis em bovinos fêmeas, em oito estados do Brasil, identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM) com a **coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes isoladas no Brasil**. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009.

As proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela SAM por Estado são apresentadas nos Apêndices I e J e gráficos 3 a 10. Os sorovares mais prevalentes com a coleção de 23 sorovares em ordem de ocorrência foram Hardjo, Shermani e Wolffi (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo). Em Minas Gerais, o terceiro colocado foi o sorovar Grippotyphosa, e em Santa Catarina a terceira posição ficou o sorovar Pomona, No Rio Grande do Sul a distribuição encontrada foi Hardjo, Australis e Shermani.

Com a coleção de antígenos ampliada por dez estirpes autóctones em ordem de ocorrência foram Guaricura, Hardjo e Shermani (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Hardjo, Guaricura e Shermani (São Paulo), Hardjo, Shermani e Guaricura (Goiás e Minas Gerais), Hardjo, Shermani e Autumnalis (Paraná), Hardjo, Shermani e Grippothyposa (Santa Catarina), Hardjo, Australis e Shermani (Rio Grande do Sul).

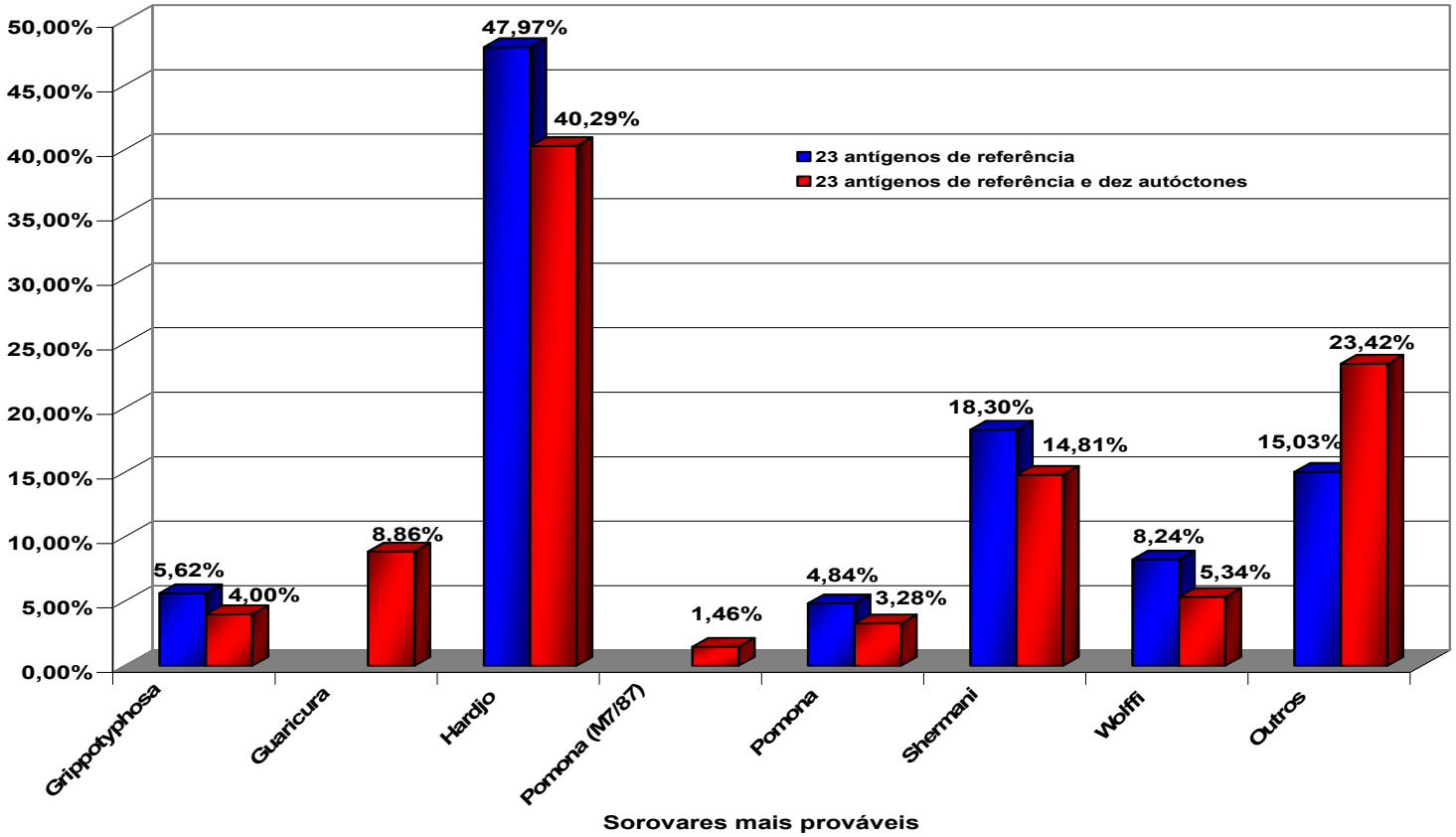


Gráfico 3 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM), em rebanhos de bovinos do Estado de **Goiás,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

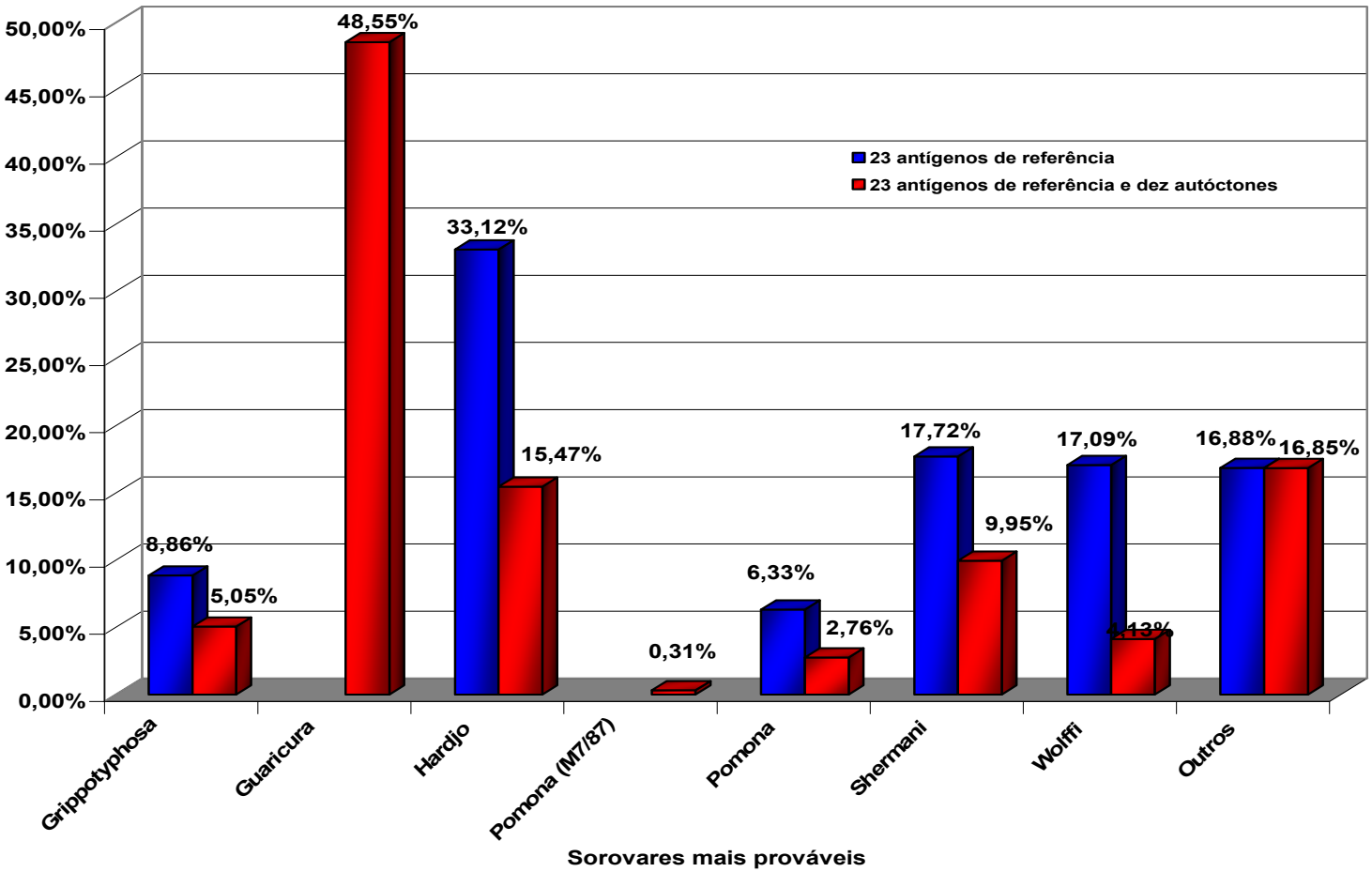


Gráfico 4 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM), em rebanhos de bovinos do Estado de **Mato Grosso,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

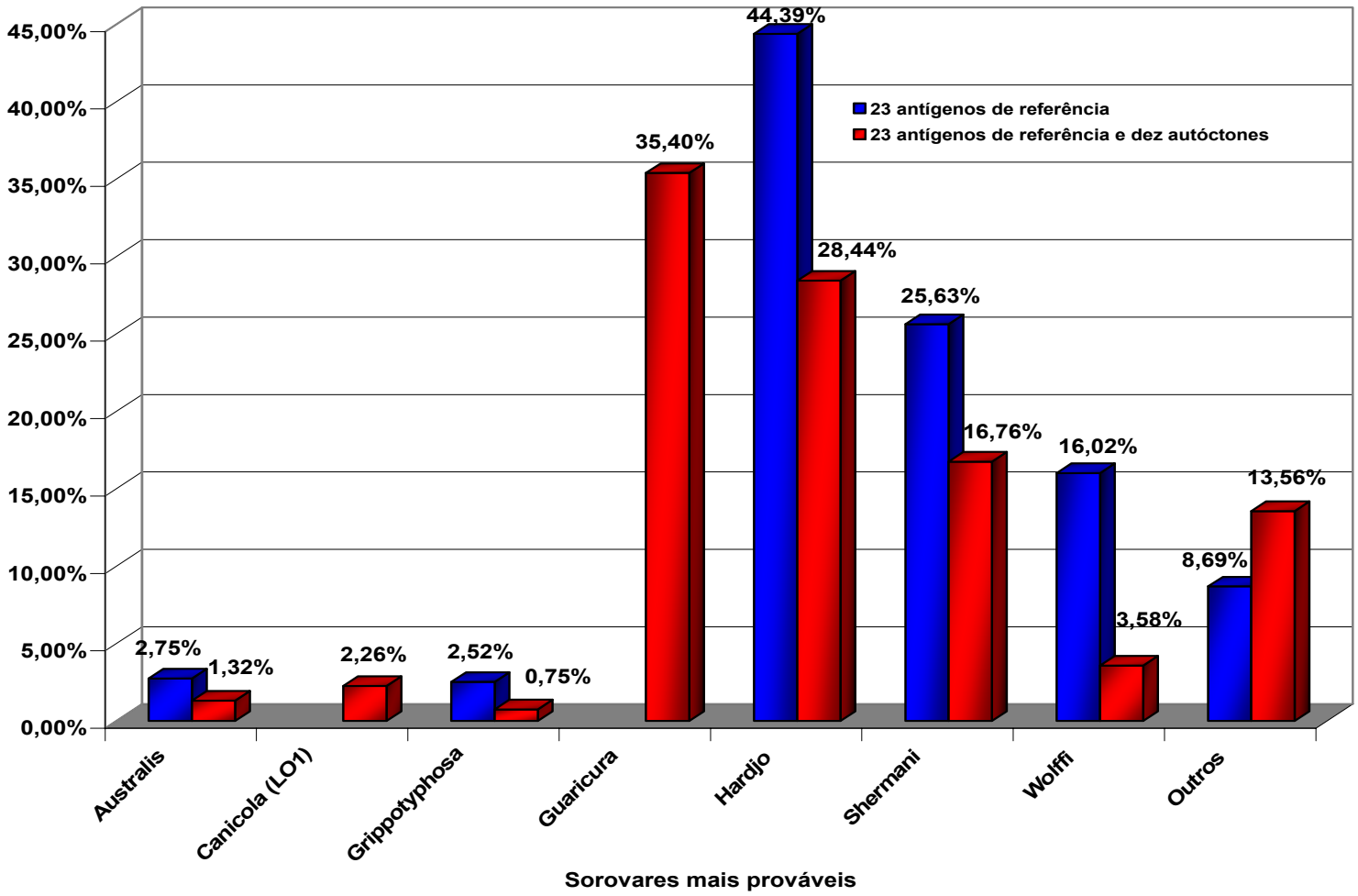


Gráfico 5 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM), em rebanhos de bovinos do Estado de **Mato Grosso do Sul,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

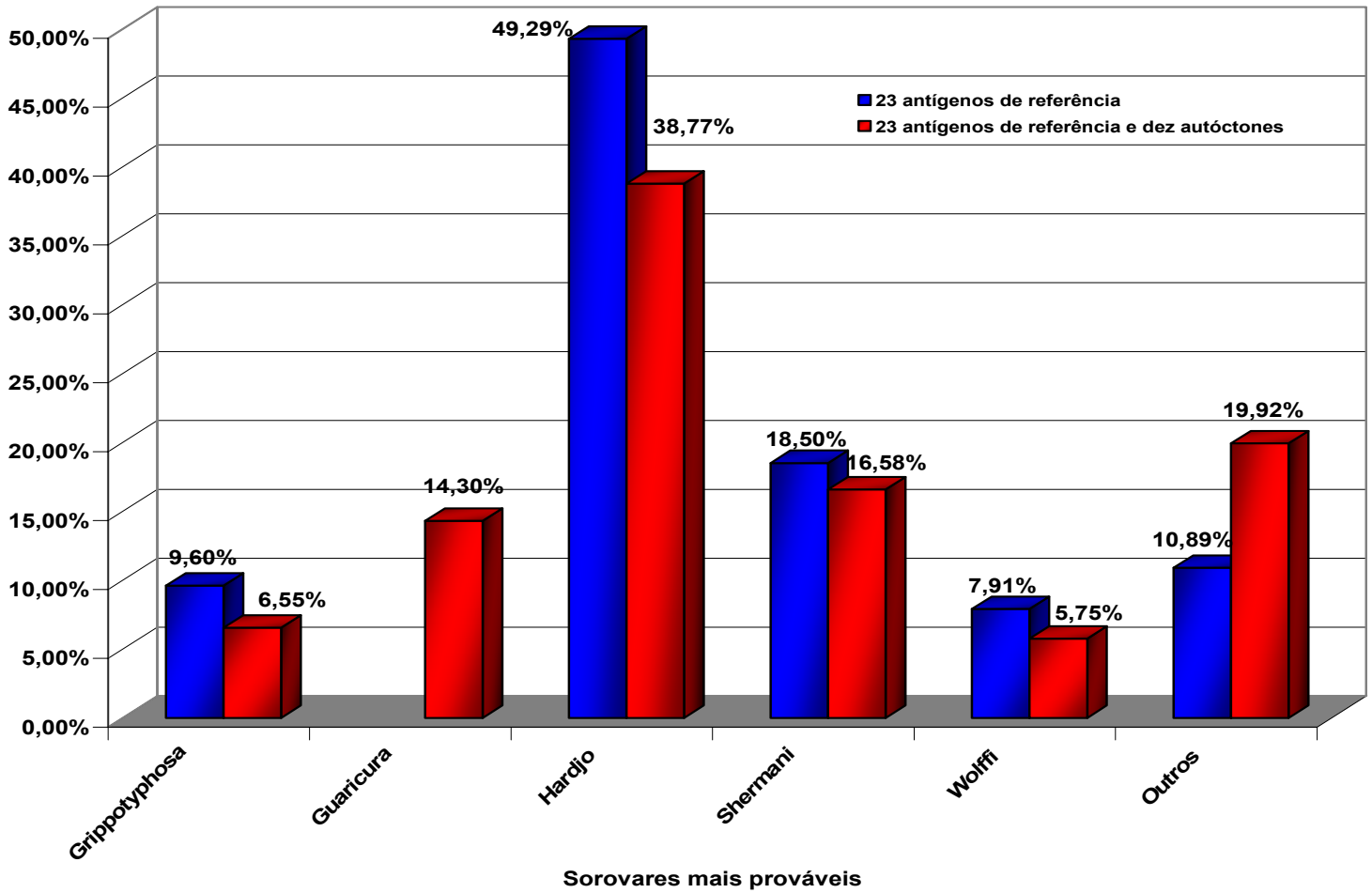


Gráfico 6 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM), em rebanhos de bovinos do Estado de **Minas Gerais,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

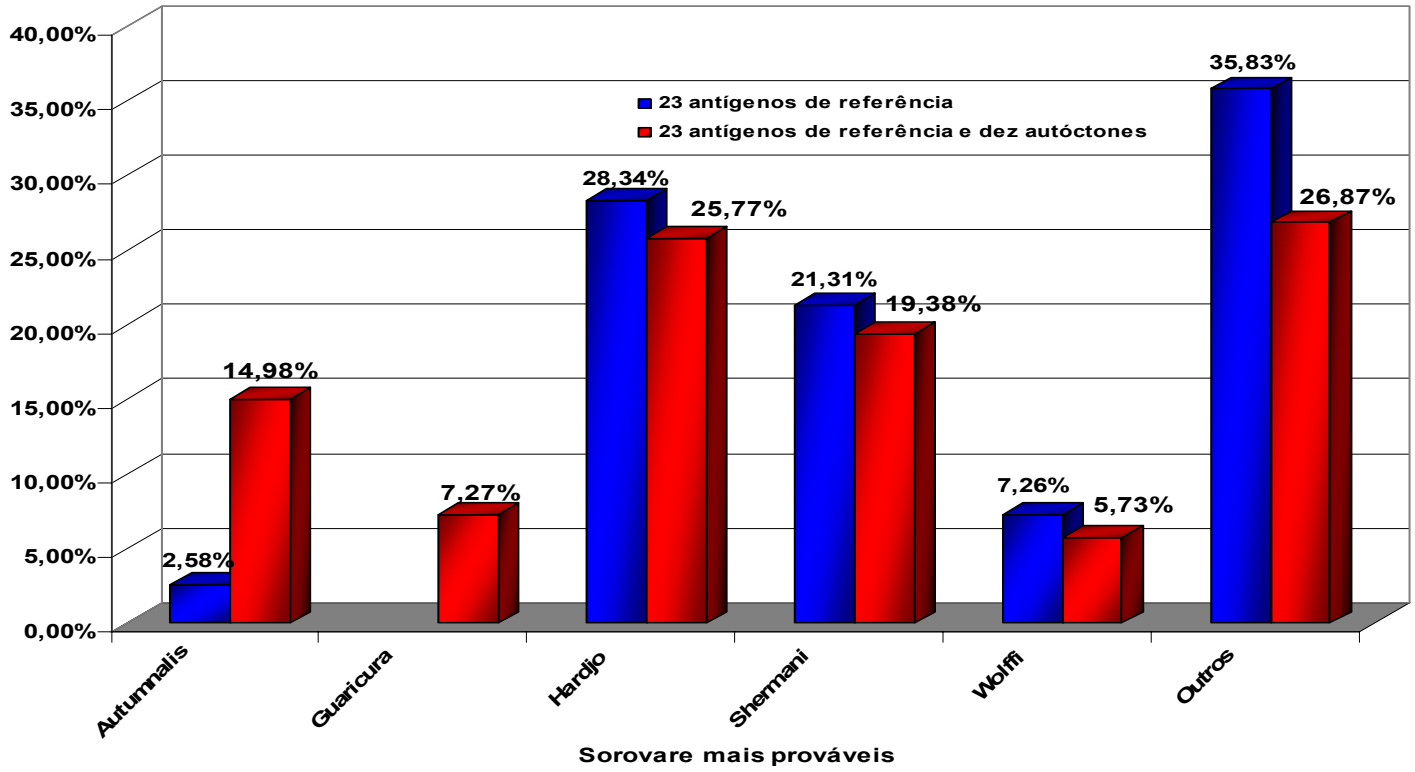


Gráfico 7 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM), em rebanhos de bovinos do Estado de **Paraná,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

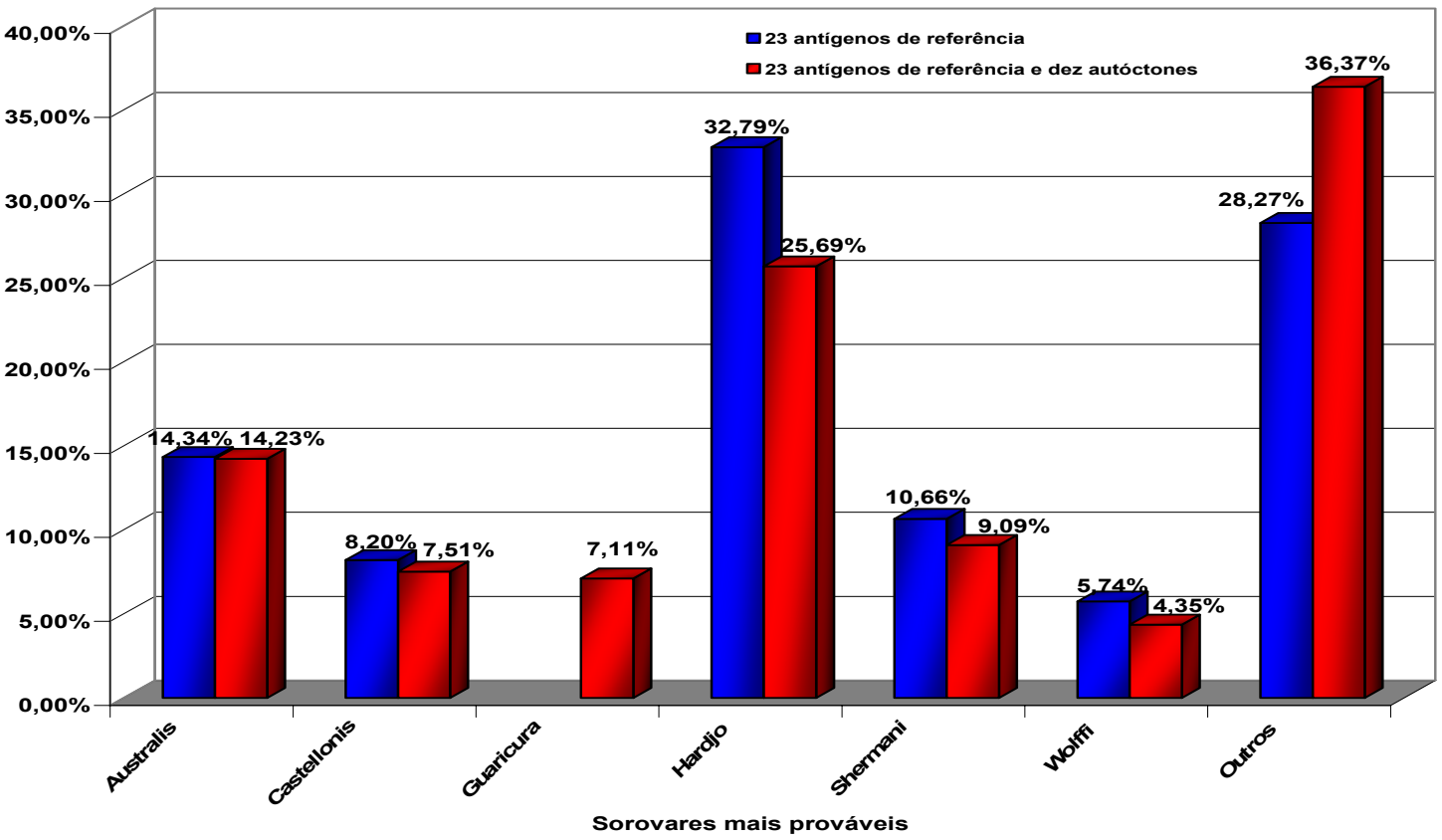


Gráfico 8 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM), em rebanhos de bovinos do Estado de **Rio Grande do Sul,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

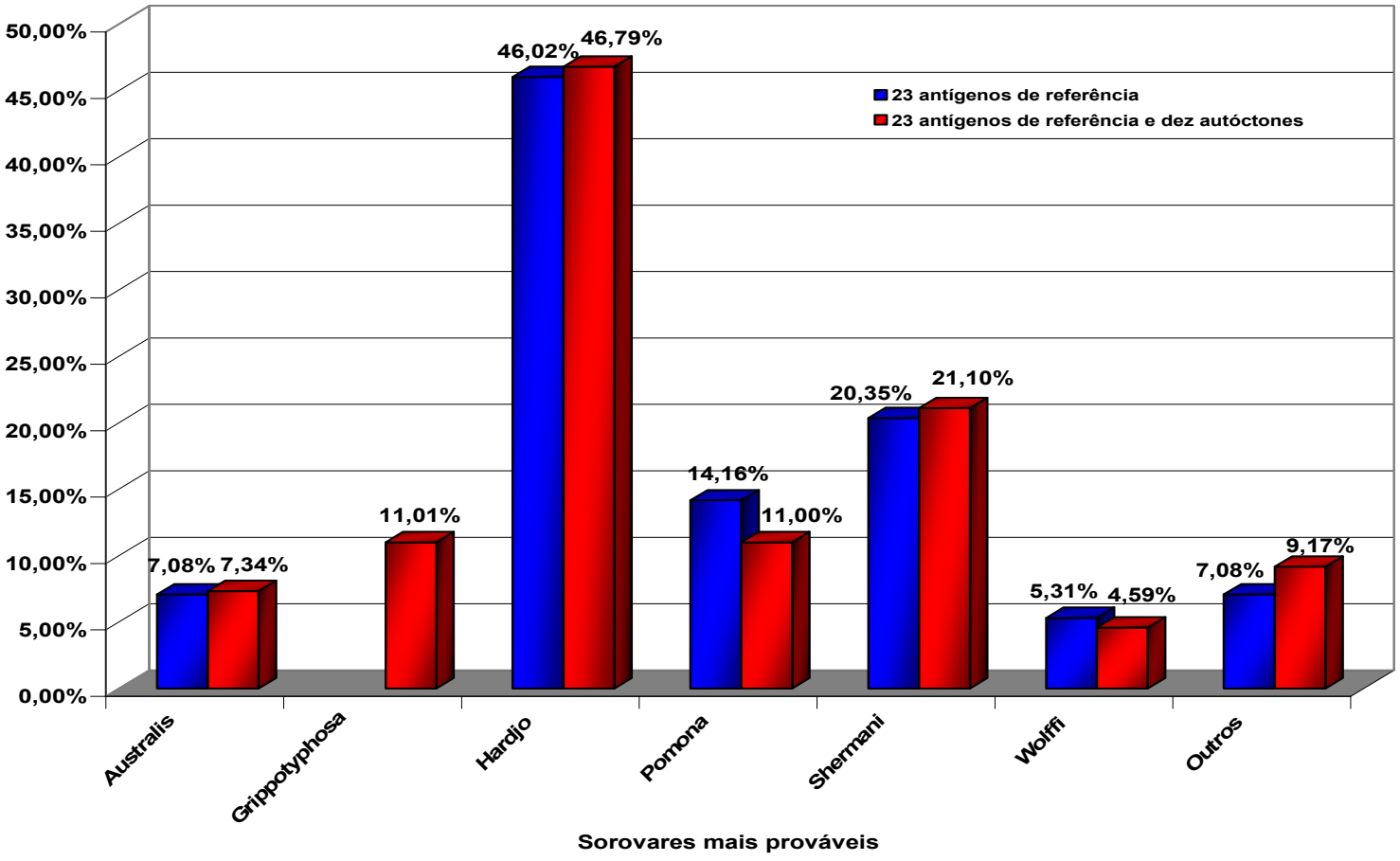


Gráfico 9 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM), em rebanhos de bovinos do Estado de **Santa Catarina,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

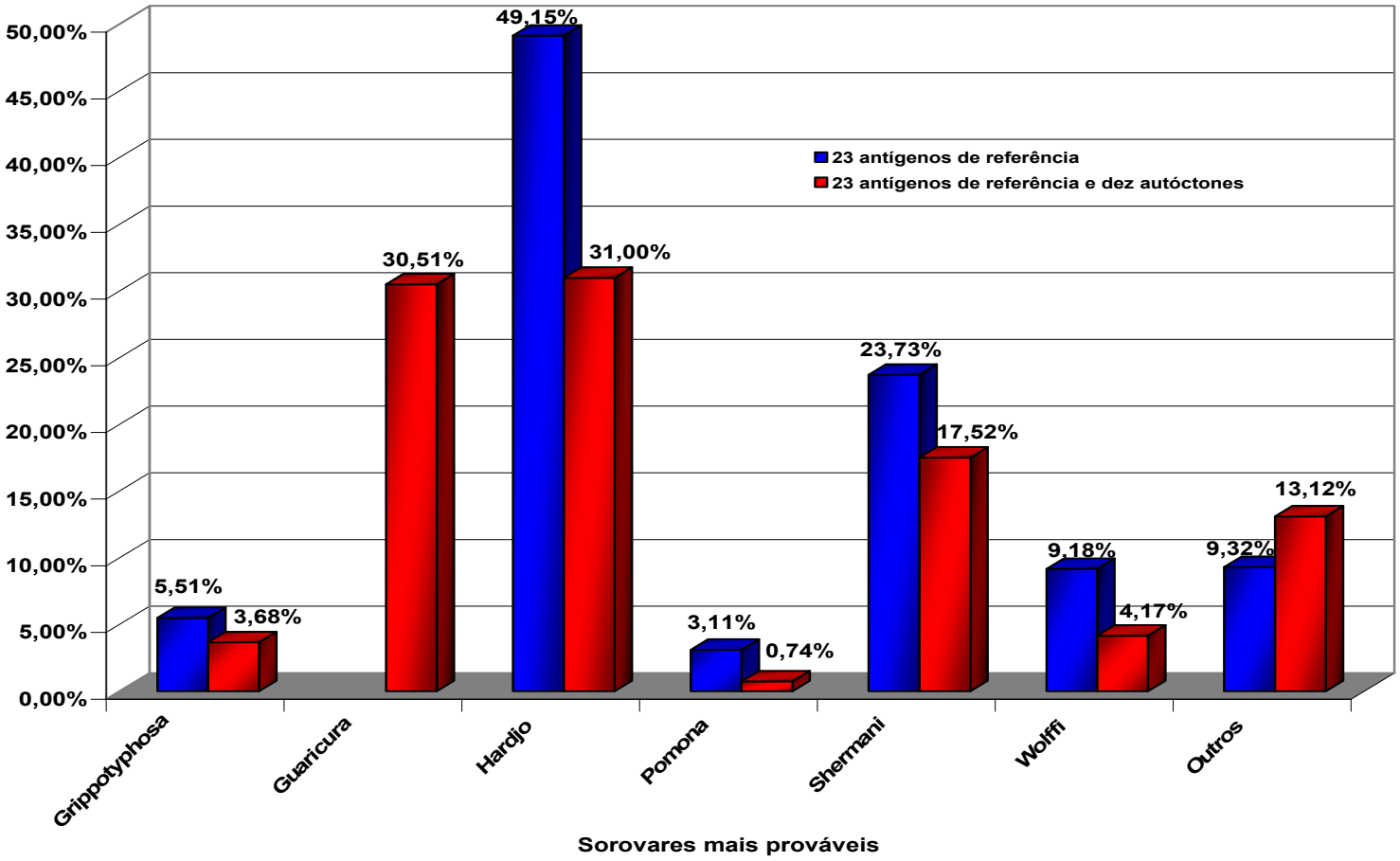


Gráfico 10 - Proporções de sorovares de leptospiras mais prováveis identificados pela microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM), em rebanhos de bovinos do Estado de **São Paulo,** segundo a coleção de antígenos empregada. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O emprego da SAM para detecção de anticorpos anti-*leptospira spp* em 9820 bovinos fêmeas em idade reprodutiva, originários de 109 propriedades distribuídas em oito Estados brasileiros, com uma coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes de leptospiras autóctones permitiu a detecção de um maior número de animais positivos que o obtido com os 23 sorovares de referência. Houve, portanto um aumento de 6 % na sensibilidade do teste, p=0,001, teste de McNemar. Quando as estirpes isoladas locais são introduzidas na coleção de antígenos da SAM, são detectados animais reagentes que teriam sido negativos com a coleção de referência, isto foi encontrado por Brod et al. 2005.

O único estado onde a diferença da sensibilidade não foi significante, foi o de Santa Catarina (p=0,522), contudo o número de propriedades examinadas neste Estado foi inferior ao dos demais. Valores no incremento da sensibilidade da SAM com o emprego de estirpes autóctones semelhantes aos obtidos no presente estudo foram encontrados por Araújo et al. (2004) 4%, em bovinos de Minas Gerais com o emprego da estirpe Norma do sorovar Hardjo, por Dias et al. (2007) 6,8%, em bovinos do Rio Grande do Sul, com as estirpes Tande do sorovar Canicola e a estirpe Caco ÉD1 da espécie *L. noguchi*, por Herrmann et al. (2002) 6,39%, em ovinos com a estirpe Norma, do sorovar Hardjo, por Silva et al. (2004) 4,5%, em ovinos do Rio Grande do Sul, com a estirpe Caco ÉD1 da *L. Noguchi*, por Oliveira (2005) 5,88%, em cães de Londrina, Paraná, com a estirpe Londrina 1 (LO1) do sorovar Canicola, pelo Centro de Controle de Zoonoses da Universidade Federal de Pelotas[1] (2004 apud SILVA, 2004, p.29) 7,4% em cães de Pelotas, Rio Grande do Sul, com a estirpe Kito É3 do sorovar Canicola, por Marchiori[2] (2003 apud SILVA, 2004, p.26 e 27) 4,1%, em eqüinos de oito municípios do Rio Grande do Sul com a estirpe Isoton É1, do sorovar Djasiman. Contudo, valores mais elevados que o observado no presente estudo foram obtidos em bovinos com a estirpe Norma do

---

[1] Centro de Controle de Zoonoses. Relatório de atividades do CCZ/Universidade Federal de Pelotas, ano de 2003, 151p., 2004

[2] MARCHIORI, M. O.; SILVA, É. F.; CARDOSO, M. C.; OLIVEIRA, L. C.; SILVEIRA, L.; BOURSCHEIDT, D.; RECUERO, A. L. C.; BROD, C. S. Prevalência de anticorpos anti-leptospira em equinos demonstra suscetibilidade dos animais analisados. In: Congresso de iniciação científica, 7; Encontro da Pós-Graduação, Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, n.157, 2003.

sorovar Hardjo, por Pereira et al. (2004) 12,7% em Minas Gerais, Tocantins (2007) 11%, no Mato Grosso e por Pellegrin et al. (1999) 36,39% no Pantanal Mato-grossense. No Rio Grande do Sul Brod et al. (2002) encontraram uma diferença de 19% em cães examinados , com a estirpe Tande, do sorovar Canicola. Tais diferenças poderiam ser atribuídas a fatores regionais, tais como a localização do isolamento da estirpe autóctone, e também a fatores sazonais, relacionados a época do ano em que foram efetuadas as colheitas de sangue (FAINE, 1982; SEYFFERT et al., 2004).

Os sorovares mais prováveis no presente estudo são apresentados nas tabelas 3 e 4 e gráficos 1 a 10. Tanto com a coleção de 23 sorovares de referência, como com a coleção ampliada por dez estirpes locais isoladas no Brasil, o primeiro colocado foi o sorovar Hardjo (Hardjoprajtino), porém a estirpe autóctone Guaricura, do sorogrupo Sejroe, o mesmo aonde estão incluídos os sorovares Hardjo e Wolffi, foi a segunda com maior número de reatores. Este resultado sugere a existência de reações cruzadas entre os representantes do mesmo sorogrupo e inclusive a possível presença da estirpe autóctone Guaricura em pelo menos 27 (24,77 %) das 109 propriedades trabalhadas. A confirmação definitiva só poderá ser de fato esclarecida com novas investigações que empreguem o isolamento e a tipificação de amostras.

Destacam-se ainda os resultados obtidos nas propriedades oito e 77, quadro 3, onde o sorovar mais provável com a coleção ampliada foi a estirpe LO14 do sorovar Canicola. Esta estirpe isolada do rim de bovinos no Estado do Paraná (ZACARIAS et al., 2008), poderia estar ocorrendo em outros Estados do país. De fato as duas propriedades em questão estão localizadas no Estado de Goiás. Estes resultados sugerem a existência de um possível ciclo de transmissão envolvendo bovinos e cães.

Os resultados apresentados na Tabela 3 e gráficos 1 e 2 revelaram que no conjunto de animais examinados, os três sorovares mais prováveis observados com a coleção de antígenos de referência foram em ordem de ocorrênca Hardjo, Shermani e Wolffi. Destes apenas o sorovar Hardjo já foi isolado e tipificado no Brasil (MOREIRA, 1994) O sorovar Wolffi só foi isolado no Brasil de roedores silvestres (*Akodon arviculoides*) (CORREA et al., 1965/1967), camundondongo (*Mus musculus*) (GIORGI et al., 1984) e de seres humanos (CORREA et al., 1965/1967), porém nunca foi encontrado em bovinos. O sorovar Shermani nunca foi isolado no

Brasil. O seu isolamento original foi efetuado em 1967 de um roedor selvagem (*Proechimys semispinosus*), capturado no canal do Panamá (UNIVERSITY OF BELGRADE, 1999). As reações para o sorovar Shermani também poderiam ser consideradas como paradoxais, ou seja, títulos mais elevados para sorovar diferente do infectante (TURNER, 1968). Contudo, em Rondônia, Aguiar (2006) constatou o sorovar Shermani foi o terceiro mais frequente, precedido pelos sorovares Hardjo e Wolffi Com a coleção de antígenos ampliada por dez estirpes autóctones houve uma alteração no perfil dos sorovares mais prováveis encontrados no conjunto de animais examinados tabela 3 e gráficos 1 e 2. A segunda posição passou a ser ocupada pela estirpe M4/84 do sorovar Guaricura, estirpe autóctone originalmente isolada por Santa Rosa et al. (1980) em bovinos do Estado de São Paulo e posteriormente, por Vasconcellos et al. (2001) em búfalas no Vale da Ribeira, SP. Esta constatação sugere a ocorrência de reações cruzadas entre os sorovares Hardjo e Guaricura que só poderão ser esclarecidas por novas investigações com isolamento e tipificação.

Persistindo na análise dos resultados apresentados na tabela 3, pode-se verificar o comportamento das estirpes do sorovar Canicola empregadas no presente estudo. De fato com a estirpe de referência houve apenas 23 animais (0,59%) em que o sorovar Canicola foi o mais provável, contudo com a inclusão de três estirpes autóctones deste sorovar LO1, LO4 e LO14, isoladas em Londrina, Paraná respectivamente de cão, suíno e bovino, o número de animais reatores passou a ser de 186 (4,24%). Houve, portanto um aumento de 163 animais. A estirpe mais freqüente dentre as três autóctones empregadas foi a LO14 que contou com 122 animais reagentes (2,78%), esta estirpe foi isolada do rim de bovinos em abatedouro, do Estado do Paraná (ZACARIAS, 2008), isto sugere que a mesma possa estar ocorrendo nos rebanhos bovinos do País.

Nos gráficos de 3 a 10 são comparadas as proporções de reações observadas para os sorovares mais prováveis por estado, pode-se observar, de um modo geral, que com o emprego da coleção de antígenos ampliada por dez estirpes autóctones foram identificados animais reatores para o sorovar Guaricura e houve a redução na proporção de animais reatores para o sorovar Hardjo. Contudo especial destaque deve ser dado para os resultados apresentados nos gráficos 4 e 5 respectivamente de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, onde a presença de animais reatores para o sorovar autóctone, Guaricura superou a obtida com o sorovar Hardjo de referência, no Estado do Mato Grosso esta diferença foi significante do valor

obtido para o sorovar Hardjo (*p*= 0,0001). e no Estado do Mato Grosso.do Sul a despeito do valor absoluto ter sido superior para o sorovar Guaricura, a diferença observada com o sorovar Hardjo foi destituída de significado estatístico (*p*=.0,753). A ocorrência superior do sorovar Guaricura pode suscitar dúvidas quanto a eficiência esperada para o controle da leptospirose com o emprego de bacterinas produzidas com diferentes sorovares de um mesmo sorogrupo, contudo, Tabata et al. (2002) constataram a existência de proteção cruzada quando ensaiaram bacterinas experimentais produzidas com os sorovares Hardjo, Wolffi e Guaricura.

A predominância do sorovar Guaricura em cinco estados dos oito Estados estudados, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo distribuídas nas regiões Centro-Oeste e Sudeste e a pequena ocorrência nos Estados do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sugere a possível existência de influências climáticas ou mesmo de diferenças na suscetibilidade das raças ou linhagens de animais exploradas em tais Estados. De fato o clima predominante nos estados do sul é o temperado, enquanto no sudeste e centro-oeste é o sub-tropical e as raças exploradas no sul são predominantemente européias, enquanto no centro-oeste e sudeste predominam os cruzamentos com raças zebuínas, indianas.

As proporções de 59,12% de animais sororeatores para leptospirose em todas as propriedades examinadas com a coleção de 23 sorovares de leptospira de referência e de 65,2% com a coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes isoladas no Brasil encontradas no presente estudo, foram próximas aos resultados obtidos no Estado da Bahia por Doria e Santana (1976) 43%, por Caldas et al. (1977) 51,8% , por Viegas et al (1986) 68,9%, por Favero et al. (2001) 61%, por Oliveira (2008) 45,42%; no Estado de Mato Grosso por Madruga et al. (1980) 74,3%, por Favero et al. (2001) 62,5%, por Tomich et al., (2007) 50,71% , por Tocantins (2007) 57,93%; no Estado do Rio de Janeiro, por Lilenbaum e Santos (1995) 68,39%, Vasconcellos et al. (1997) 57,40%, Favero et al. (2001) 41,3%, por Lilenbaum e Souza (2003) 46,9%; no Rio Grande do Sul por Brod et al. (1995), 70,42% em raças leiteiras com problemas reprodutivos, por Vasconcellos et al. 1997 70,22% ; no Estado de São Paulo, por Vasconcellos et al. (1997) 55,35%, por Langoni et al. (2000) 45,56%, por Castro et al. (2008) 49,4%, no Estado de Pernambuco por Oliveira et al. (2001) 47,63 %, por Tenório et al. (2005) 57,7%; no Estado do Pará, por Negrão (1999) 65,9%; no Estado de Minas Gerais por

Vasconcellos et al. (1997) 53,90%, por Favero et al. (2001) 41,3% ; no Estado de Mato Grosso do Sul, por Vasconcellos et al. (1997) 70,53%, por Favero et al. (2001) 62,3%, no Estado de Goiás por Favero et al. (2001) (46,5%), no Estado do Paraná por Vasconcellos et al. (1997) 51,89%, no Estado da Paraíba por Lage et al. (2007), 32,39%. Contudo proporções de animais reatores superiores as encontradas no presente estudo foram observadas, no Estado da Bahia por Caldas et al. (1993) e Caldas et al. (1995/1996), em torno de 80%, por Viegas et al. (2001) entre 81,4% a 100%; no Estado de Goiás por Juliano et al. (2000) 81,90% e por Moreira et al. (2006) 81,1%; no Estado do Amazonas, por Homem et al. (2001) 97%; no Estado de São Paulo, por Martins (2005) 88,4% e no Estado do Mato Grosso por Figueiredo (2007) 98,8%. Estes valores confirmam a elevada taxa de infecção por leptospiras no rebanho bovino e destacam a importãncia em saúde animal desta zoonose.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições em que o presente estudo foi realizado permitem a obtenção das seguintes conclusões:

1) A coleção de antígenos da SAM incluindo estirpes autóctones isoladas no Brasil propiciou o aumento significativo do número de bovinos identificados como reatores para a leptospirose.
2) Não houve diferença no número de propriedades identificadas com pelo menos um animal reator para a leptospirose segundo a coleção de antígenos empregada na reação de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose.
3) Com a coleção de antígenos constituída por 23 sorovares de leptospira de referência os três sorovares identificados como mais prováveis em bovinos de cinco Estados do país (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná) foram Hardjo, Shermani e Wolffi. Nos Estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além dos sorovares Hardjo e Shermani, a terceira colocação foi respectivamente, Grippotyphosa, Pomona e Australis.
4) Com a coleção de antígenos constituída por 23 sorovares de leptospiras de referência e dez autóctones, os três sorovares identificados como mais prováveis em bovinos de cinco Estados do Brasil (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Goiás), foram Hardjo, Guaricura e Shermani. Nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina entre os três sorovares mais prováveis além do Hardjo e Shermani foram incluídos, respectivamente, Autumnalis, Australis e a dupla Grippotyphosa e Pomona.
5) O sorovar Guaricura, estirpe do sorogrupo Sejroe isolada no Brasil de bovinos e búfalos, ocupou posição de destaque como sorovar mais provável em rebanhos bovinos de cinco Estados do País (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Goiás),

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In:_____ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Bacteriosis. 3. ed. Washington: Organizacion Panamericana de La Salud, 2001. v. 1, p. 175-186. (Publicacíon científica y técnica, n. 580).

ADLER, B.; FAINE, S. The antibodies involve in the human immune response to leptospiral infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, p. 387-400, 1978.

ADLER, B.; PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 2009, xxx10 p.

AGUIAR, D. M. **Prevalência de anticorpos anti-neospora caninum, anti-brucella abortus e anti-leptospira spp. em bovinos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia: estudos de possíveis fatores de risco**. 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

AGUIAR, D. M.; GENNARI, S. M., CAVALCANTE, G. T.; LABRUNA, M. B., VASCONCELLOS, S. A.; RODRIGUES, L. A. R.; MORAES, Z. M.; CAMARGO, L. M. A. Seroprevalence of *Leptospira spp* in cattle form Monte Negro municipality, western Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 102-104, 2006.

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

ALVES, V. A. F.; VIANNA M. R.; YASUDA, P. H.; DE BRITO, T. Detection of Leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **Journal Pathology**, v. 159, p. 123-131, 1987.

ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MORAIS, Z. M. Influência de fatores ambientais na proporção de caprinos soro-reagentes para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba**. Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 11-18, 1996.

AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F. Bovine leptospirosis. **The Veterinary Bulletin**, v. 45, n. 12, p. 875-891, 1975.

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

AVILA, J. A.; COSTA, A. J.; MORAES, F. R.; PINHEIRO, L. E. L.; MANGERONA, A. C. S. Pesquisa de alglutininas anti-Leptospira em soros de bovinos do município de Jaboticabal, Brasil. **Revista Científica**, Jaboticabal, v. 6, n. 3, p. 451-453, 1978.

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

BARTHI, A. R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet infectious Diseases**, v. 3, 2003, 15 p.

BENEDICTO, T. K. **Pesquisa de aglutinias para leptospirose bovina nos municípios de Altinópolis e Santo Antônio da Alegria, Estado de São Paulo, estudo da prevalência e fatores de risco**, 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

BIANCIFIORI, F.; CARDARAS, P. Enzyme-Linked immunoassay in the diagnosis of leptospirosis in domestic animals using peroxidade-conjugated protein-A. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases,** v. 6, p. 57-65, 1983.

BOLIN, C. A.; KOELLNER, P. Human to human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. **Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 246-247, 1988.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animal. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery. Small Animal,** v. 11, n. 3, p.166-171, 1996.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Clinical Signs, Diagnosis, and Prevention of Bovine Leptospirosis. **The Bovine Practitioner**, v. 33, n. 1, p. 50-54, 1999.

BONFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. C. Evalution of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 89-94, 2005.

BRASIL. Ministério da saúde. **Manual de leptospirose**. Brasília, 1995. 98 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Leptospirose. Brasília: DF, 2005, P.502-520.

BROD, C. S.; MARTINS, L. F. S.; NUSSBAUM, J. R.; FEHLBERG, M. F. B; FURTADO, L. R. I.; ROSADO, R. L. I. Leptospirose bovina na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 14, n. 84, p.15-20, 1995.

BROD, C. S. **Diagnóstico laboratorial na leptospirose animal e humana**. 2002. 91 f. Tese (Doutorado), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2002.

BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R.; KRAHL, M.; DELLAGOSTIN, O. A. The importance of the use of a local isolate of leptospira on detection of antibody in human and canine serum samples **International Leptospirosis Society**, Barbados, **Anais…**Barbados:ILS, 2002.

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

CABRAL, K. G. **Pesquisa de *Leptospira spp* em leite de vacas normais e mastíticas**. 1999. 99 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 1999.

CACCHIONE, R. A. Leptospiras y Tecnicas de Laboratorio. Secretaria de Estado de Agricultrua y Ganaderia de Las Nacion. Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Instituto de Zoonosis. Série Tecnica Nueva. **Revista de Investigaciones Ganaderas,** v. 14, n.16, 1962.

CALDAS, E. M.; TISHCENKO, L. M.; PEREIRA FILHO, M.; CÂMARA, J. Q.; SAMPAIO, M. B.; CUNHA, J. B.; SANTOS, M. L. Aglutininas antileptospira em hemo-soro de animais. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 2, n. 1, p. 83-98, 1977.

CALDAS, E. M.; VIEGAS, E. A.; VIEGAS, S. A. A.; REIS, R. S.; SANTOS, M. S. Aglutininas antileptospira em hemo-soro de animais domésticos no estado da Bahia, 1990-1993. Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, v. 16, n. 1, p. 49-59, 1993.

CALDAS,E. M.; VIEGAS, E. A.; VIEGAS, S. A. A.; REIS, R. S. Aglutininas anti-leptospira em hemosoro de animais domésticos no Estado da Bahia. Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, v. 18, n. 1, p. 268-280, 1995/1996.

CAMPBELL, A. M. **Monoclonal and immunosensor technology.** Amsterdan: Elsevier, 1991.

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

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**. Review, 2009, 9 p.

CHAPMAN, A. J., ADLER, B; FAINE, S. Genus-specific antigens in Leptospira revealed by immunoblotting. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene [A]**, v. 264, p. 279-293, 1987.

COLE J. R.; SULZER, C. R.; PULSSELY, P. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic aglutination. **Applied Microbiology.** v. 25, n. 6, p. 976-980, 1973.

CORREA, M. O.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; GALVÃO, P. A. A.; AGUIAR, H. A. Estudos sobre a *Leptopira wolffi* em São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 25/27, p. 11-25, 1965/67.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Leptospiroses. 2ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. cáp. 21, p. 219-231.

CORREA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A.; BARROS, M. A.; GUIMARÃES, V.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 189-193, 2004

DELBEM, A. C. B.; FREITAS, J. C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; MULLER, E. E.; OLIVEIRA, R. C. Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 174-177, 2002.

DIAS, L. P.; STONE, S. C.; JORGE, S.; RECURERO, R. C.; STARK, C. B.; HENTGES, A.; RECUERO, A. L. C.; FERNANDES, C. P. H.; BROD, C. S. Soroprevalência de leptospirose bovina na zona sul do Rio Grande do Sul, Brasil In: Congresso de Iniciação científica, 16; Encontro de Pós-Graduação, 9, 2007, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas. **Anais...**p.[4].

DORIA, J. D.; SANTANA, E. C. Leptospirose IV. Aglutininas anti-leptospira em soros de bovinos no Estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Medicna Veterinária da Universidade Federal da Bahia.** Salvador, v. 1, n. 1, p.74-79, 1976.

DORIA, J. D.; VIEGAS, S. A. R.; VIEGAS, E. A.; VIRGENS, N. C.; SANTOS, N. M. Investigação sorológica de doenças ligadas a esfera reprodutiva em bovinos, no Estado do Pará. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.** v. 7, n.1, p. 97-104, 1982.

ELLINGHAUSEN, H. C.; McCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate. **Animal Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 45, 1965.

ELLIS, W. A., O'BRIEN, J. J., BRYSON, D. G. Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar hardjo infection. **Veterinary Record**, v. 117, p.101-104, 1985.

ELLIS, W. A., O'BRIEN, J. J., BRYSON, D. G. Bovine leptospirosis: experimental serovar hardjo infection. **Veterinary Microbiology**, v. 11, p. 293-299, 1986.

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

FAGUNDES, M. Q.; SEIXAS, F. K.; HARTWIG, D.; SILVA, E.; GRASSMANN, A. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Tipificação de isolados de Leptospira pela análise de VNTR (número variável de repetições em tandem) através da eletroforese capilar. In Congresso de iniciação científica, 17; Encontro de Pós-Graduação, 10, 2008, Pelotas. **Anais...** [5].

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982.171 p. (Who Off set Publication, 67).

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

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd ed. Melbourne, Austrália: Medicine Science, 1999. 272 p.

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

FEIGIN, R. D.; ANDERSON, D. C. Human leptospirosis. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.** v. 5, p. 413, 1975.

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

FONTANALS, A.; LORENTE, P.; SAMARTINO, L. MUNDO, S. *Leptospira interrogans* serovar Pomona: Detección de diferencias antigénicas entre tres aislamientos regionales de bovinos y una cepa de referência. **Revista Argentina de Microbiologia,** v. 33, p. 108-112, 2001.

FREITAS, D. C.; LACERDA, J. R.; VEIGA J. S.; LACERDA J. P. G. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.** v. 6, n. 1, p. 16-19. 1957.

FREITAS, J. C.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, R. C.; DELBEM, A. C. B.; MÜLLER, E. E.; ALVES, L. A.; TELES, P. S. Isolation of *Leptospira spp* from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004.

GALLOWAY, R. L.; LEVETT, P. N. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. **American Journal Tropical Medical Hygiene.** v. 78, n. 4, p. 628-632, 2008.

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

GANGADHAR, N. L.; RAJASEKHAR, M.; SMYTHE, L. D.; NORRIS, M. A.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M. F. Reservoir hosts of *Leptospira inadai* in Índia. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics), v. 19, n. 3, p. 793-799, 2000.

GIORGI, W.; TERUYA, M.; SILVA, A. S.; GENOVEZ, M. E. Leptospirose: resultados das soro-aglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974/1980. **Biológico**, São Paulo, v. 47, n. 11, p. 299-309, 1981.

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

GONÇALVES, A. J.; LAZERA, M. S.; PINTO, A. M.; MELO, J. C.; TEIXEIRA, C. R.; COSTA, I. C.; ANDRADE, J.; SANTOS, A. R.; VERAS, F. M.; DUARTE, F. Leptospiroses – Revisão de 90 pacientes internados no Hospital Estadual São Sebastião, Rio de Janeiro, no período de janeiro/76 a dezembro/77. **Folha Médica.** v. 82, n. 2 p. 93-102, 1981.

GUIDA, V. O; CINTRA, M. L.; SANTA ROSA, C. A.; CALDAS, A. D.; CORREA, M. O.; NATALE, V. Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em soros de bovinos do Estado de São Paulo, **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 26, p. 49-64, 1959.

GUIMARÃES, M. C.; CORTES, J. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e o seu controle terapêutico. **Comunicado Científico a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.** Universidade de São Paulo, v.6/7, n. 1/4, p. 21-34, 1982/83.

HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis: Current Status and Future Trends. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24. n. 4, p. 309, 2009.

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, p.32-34, 1999.

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

HERRMANN, J. L.; BARIL, C., BELLENGER, E.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Genoma conservation in isolates of Leptospira interrogans. **Journal Bacteriology**, v. 173, p. 7582-7588, 1991.

HERRMANN, J. L.; BELLENGER, E.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Not*I digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, 1992.

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

HIGGINS, R. J., HARBOURNE, J. F.; LITTLE, T. W. A. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospirosa* of the serotype *hardjo*. **Veterinary Record**, v. 107, p. 307-310, 1980.

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

INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF LEPTOSPIRA. Minutes of the Meeting, Manchester, England. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 258-259, 1987.

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

JOUGLARD, S. D. D. Diagnóstico de Leptospirose por PCR e caracterização de isolados de Leptospira spp por sequenciamento do 16S rDNA e análise de VNTR 2005. 71 F. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005

KO, A. I.; REIS, M. G.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON JUNIOR, W. D.; RILEY, L. W.; SALVADOR LEPTOSPIROSIS STUDY GROUP Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil.**The Lancet**, v. 354, p. 820-825, 1999.

LAGE, A. P.; LEITE, R. M. H.; THOMPSON, J. A. BANDEIRA, D. A.; HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; GONÇALVES, V. S. P. Serology for *Leptospira sp* in cattle of the state of Paraíba, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p.185-190, 2007.

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

LANGONI, H.; SOUZA, L. C.; SILVA, A. V.; CUNHA, E. L.; SILVA, R. C. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira spp* antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties form Botucatu, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** v. 45, n. 3, p. 190-199, 2006.

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

LEVETT, P. N. Leptospirosis: A forgotten zoonoses? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 435-448, 2004.

LEVETT, P. N. Sequence-based typing of Leptospira: Epidemiology in the Genomic Era. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, 2007.

LINDSTEDT, B. A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis,** v, 26, p. 2567-2582, 2005.

LILENBAUM, W.; SANTOS, M. R. C. Leptospirosis in animal reproduction. III. The role of serovar Hardjo in bovine lepotospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 37, n. 2, p.87-92, 1995.

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

LOMAR, A. V.; DIAMENT, D.; TORRES, J. R. Leptospirosis in Latin América. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, n. 1, p. 23-39, 2000.

LOMAR, A. V.; DIAMENT, D.; BRITO, T.; VERONESI, R. Leptospiroses. In_____. VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds). **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 1007-1023.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; PUTT, N. Freqüência de aglutininas anti-leptospira em bovinos de corte da região sul de cerrado do Estado do Mato Grosso. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p. 245-249, 1980.

MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in Leptospira interrogans Sensu Stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 539-545, 2005.

MARTINS, L. S. **Situação epidemiológica da leptospira bovina, canina e humana na área rural do município de Pirassununga**, SP, 2005. 79 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MARVULO, M. F. V.; PAULA, C. D.; FERREIRA, P. M.; MORAIS, Z. M.; DELBEM, A. C. B.; FAVERO, A. C. M.; MIRAGLIA, F.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E.; FERRAZ, E.; PENTEADO, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of Leptospira in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. In: CONGRESSO DE BARBADOS, INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY, **Anais...** Barbados, 2002. p. 62.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; MORAIS, Z. M.; PINTO, C. O.; SUCUPIRA, M. C. A.; DIAS, R. A.; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A. COSTA, S. S.; TABATA, R.; MARCONDES, A. G. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 25-32, 2002.

MEIRA, D. A. Leptospiroses In_____. **Clínica de Doenças Tropicais e infecciosas.** Rio de Janeiro: Interlivros, 1991. p. 207-220.

MINEIRO, A. L. B. B.; BEZERRA, E. E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; COSTA, F. A. L.; MACEDO, N. A. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1103-1109, 2007.

MIRAGLIA, F.; MORENO, A. M.; GOMES, C. R.; PAIXÃO, R.; LIUSON, E.; MORAIS, Z. M.; MAIORKA, P.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; VASCONCELLOS, S. A. Isolation and characterization of *Lepospira interrogans* form pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 501-507, 2008.

MOREIRA, E. C.; SILVA, J. A.; VIANA, F. C.; SANTOS, W. L. M.; ANSELMO, F. P.; LEITE, R. C. Leptospirose bovina: I – Aglutininas anti-leptospiras em soros anguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 32, n. 3, p. 375-388, 1979.

MOREIRA, E. C**. Avaliação dos métodos para erradicação de leptospirose em bovinos leiteiros.** 1994. 94 f Tese (Doutorado) – Escola de Medicina Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1994.

MOREIRA, R.; CABRAL, D. D.; OLIVEIRA, P. R.; LIMA, A. L. C. Levantamento da Prevalência sorológica para *Leptospira interrogans* em vacas leiteiras na região de Goiandira, Goiás, **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 103, 2006.

MYERS, D. M. **Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratório de la leptospirosis**. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985

NEGRÃO, A. M. G. **Diagnóstico da leptospirose bovina em algumas regiões do Estado do Pará, Brasil**. 1999. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Medicina e Saúde Animal, Universidade Federal do Pará, 1999.

OLIVEIRA, A. A. F; MOTA, R. A.; PEREIRA, G. C.; LANGONI, H.; SOUZA, M. I.; NAVEGANTES, W, A.; SÁ, M. E. P. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns municipal district, Pernambuco State, Brazil. **Onderstepoort journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 275-279, 2001.

OLIVEIRA, R. C. **Utilização de estirpe regional na prova de soroaglutinação microscópica para a leptospirose canina**. 2005. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2005.

OLIVEIRA, R. C.; FREITAS, J. C.; SILVA, F. G.; SOUZA, E. M.; DELBEM, A. C. B.; ALVES, L. A.; MULLER, E. E.; BALARIM, M. S.; REIS, A. C. F.; BATISTA, T. N.; VASCONCELLOS, S. A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 111-113, 2005.

OLIVEIRA, F. C. S. **Leptospirose bovina no Estado da Bahia, Brasil. Prevalência, sorovares predominantes, distribuição espacial, fatores de risco**, 2008.123f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, D. S. C.; GUIMARÃES, M. J. B.; MEDEIROS, Z. Modelo Produtivo para a Leptospirose. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 1, 2009.

PALANIAPPAN, R. U. M.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. Leptospirosis: pathogenesis, immunity and diagnosis. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 20, p. 284-292, 2007.

PELLEGRIN, A. O.; GUIMARÃES, P. H. S.; SERENO, J. R. B.; FIGUEIREDO, J. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C. Prevalência da leptospirose em bovkinos do pantanal Mato-Grossense. **Comunicado Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Pantanal**, n. 22, p. 1-9, 1999.

PEREIRA, M. M. Leptospirose In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infeciosas e parasitárias**. Volume II. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v. 2, p. 1497-1508.

PEREIRA, P. A. C.; FERREIRA, A. M.; CARVALHO, L. B.; OLIVEIRA JR, A. C.; RODRIGUES, R. O.; LEITE, R. C. Perfil sorológico das leptospiroses em rebanhos bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba - SP. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v. 28, n. 3, p. 174-176, 2004.

PEROLAT P., **Leptospirosis**. Espace Etudiant. Cours de Bacteriologie Medicale. 2003. Disponível em: <http://www.microbes-edu.org/etudiant/Leptospira.>. Acesso em: 2 maio 2008.

QUINN, P. J.; MARKEY B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.In_____. **Espiroquetas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 179-183.

RAMADASS, P.; SAMUEL, B.; NACHIMUTHU, K. A rapid agglutination test for detection of leptospiral antibodies. **Veterinary Microbiology**. v. 70, n. 1-2, p.137-141, 1999.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E. GENOVEZ, M. É. A multiplex PCR for the detection of *Brucella sp*. And *Leptospira spp*. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 139-147, 2002.

RIET-CORREA, F.; LEMOS, R. A. A. Leptospirose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. Doenças de ruminantes e equinos. v.1, 2 ed. São Paulo: Livraria, Varela, 2001. p. 275-284.

ROMERO, E. C.; BLANCO, R. M.; GALLOWAY, R. L. Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.623-627, 2009.

SAENGJARUK, P.; CHAICUMPA, W.; WATT, G.; BUNYARAKSYOTIN, G.; WUTHIEKANUN, V. TAPCHAISRI, P.; SITTINONT, C.; PANAPHUT, T.; TOMANAKAN, K.; SAKOLVAREE, Y.; CHONGSA-NGUAN, M.; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y., KAKAMBAHETI, T.; NAIGOWIT, P.; WAMBANGCO, M. A. L.; KURAZONO, H.; HAYASHI, H. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 480-489, 2002.

SALAUN, L; MERIEN, F.; GURIANOVA, S.; BARANTON, G.; PICARDEUAU, M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3954-3962, 2006.

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

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia,** v. 1, n. 2, p. 97-109, 1970.

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; SILVA, A. S.; TERUYA, J. M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 29/30, p. 19-27, 1969/1970.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; CASTRO, A. F. P. A new leptospiral serotype in the Bataviae group isolated in São Paulo, Brazil. **American Journal Veterinary Research**, v. 33, n. 8, p. 1719-1721, 1972.

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

SCANZIANI, E. Comparation between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs.**Research in Veterinary Science**, v. 50, p. 229-232, 1991.

SEHGAL, S. C.; VIJAYACHARI, P.; SMYTHE, L. D.; NORRIS, M.; SYMONDS, M.; DOHNT, M.; KORVER, H.; KEMP, H. V.; HARTSKEERL, R. A.; TERPSTRA, W. J. Lai-like Leptospira form the Andama islands, **Indian Journal of Medical Research**, 112, p.135-139, 2000.

SEHGAL, S. C. Epidemiological Patterns of Leptospirosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 310-311, 2009.

SEYFFERT, N.; BERMUDEZ, V. L.; RECUERO, A.; BOURSCHEIDT, D.; BROD, C. S. Importância do uso de isolados locais de leptospiras nadetecção de anticorpos em humanos suspeitos de leptospirose. In:Congresso de iniciação científica. 13; Encontro de pós-graduação, 6 , 2004, Pelotas. **Anais...**., Pelotas, 2004.

SLEIGHT, S. D.; ATALLAH, O. A.; STEINBAUER, D. J. Experimental *Leptospira pomona* infection in bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p.1663-1668, 1964.

SLEIGHT, S. D. The role of penicillin and streptomycin in the prevention of transmission of bovine leptospirosis by artificial insemination. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 365-368, 1965.

SIEGEL, S. Teste de McNemar. In_____**Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento**. Editora McGran – Hill do Brasil Ltda,1981, p. 69-74.

SILVA, E. F. **Cultivo e isolamento de leptospiras do Homem, de animais silvestres e domésticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências), 2004. 39 f. – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2004

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

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

STERLING, C. R.;THIERMANN, A. B. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. **Veterinary Pathology**, v. 18, p. 628-637, 1982.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 5, p. 216-223, 1974.

TABATA, R.; SCANAVINI NETO, H.; ZUANAZE, M. A. F.; OLIVEIRA, E. M. D.; DIAS, R. A.; MORAIS, Z. M.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup sejroe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 265-268, 2002.

TENÓRIO, T. G.; MELO, L. E. H.; VASCONCELLOS, S. A.; CASTRO, R. S.; SILVA, F. F.; LEITE, J. E. B.; REGO, E. W.; VAZ, B. B. D.; BORBA, M. A. C.; MELO, M. T.; CASTRO, V. B.; CAMPOS, K. M.; BERTO, R. S.; MENDES, E. I. Soroprevalência da brucelose e da ledptospirose em rebanhos de bovinos leiteiros do Estado de Pernambuco. **Veterinária Notícias, Uberlândia**, v. 11, n. 2, p. 43-48, 2005.

TERPSTRA, W. J.; KORVER, H.; LEEUWEN, J. V.; KLATSER, P. R.; KOLK, A. H. J. The classification of Sejroe group serovars of Leptospira interrogans with monoclonal antibodies. Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologiie und Hygiene **International Journal of Microbiology and Hygiene**, **A,** v. 259, p. 498-506, 1985.

TERPSTRA, W. J. Typing of Leptospira from the perspective of a reference laboratory, **Acta Leidensia**, v. 60, p. 79-87, 1991.

THIERMANN, A. B. Isolation of leptospires in diagnosis of leptospirosis. **Modern Veterinary Practice**, v. 65, n. 10, p. 758-759, 1984.

THAIPADUNGPANIT, J.; WUTHIEKANUN, V.; CHIERAKUL, W.; SMYTHE, L. D.; PETKANCHANAPONG, W.; LIMPAIBOON, R.; APIWATANAPORN, A.; SLACK, A. T.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WHITE, N. J.; FEIL, E. J.; DAY, N. P. J.; PEACOCK, S. J. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with outbreak of human leptospirosis in Thailand. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 1, 2007, 6 p.

TOCANTINS, S. **Distribuição especial da prevalência de aglutininas anti-leptospira em bovinos em Cáceres**, MT, Brasil. 2005. 81 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

TOMICH, R. G. P. BONFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; STANCIOLI, E. F. B. Leptospirosis serosurvey in bovines form brazilian pantanal using IgG ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test . **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 674-680, 2007.

TURNER, L. H. Leptospirosis I. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 6, p. 842-855, 1967.

TURNER, L. H. Leptospirosis II. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 6, p. 880-898, 1968

TURNER. L. H. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 4, p. 623-645, 1970.

UNIVERSITY OF BELGRADE. Royal Institute Tropical, Amsterdam. Leptospira classification. 1999. Disponível em: <http://www.vet.bg.ac.yu/lepto>. Acesso em: 17 fev. 1999.

VASCONCELLOS, S. A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicado Científico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 1, p.17-24, 1987.

VASCONCELLOS, S. A; BARBARINI JÚNIOR, 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 a abril de 1996. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 64, n. 2, p. 7-15, 1997.

VASCONCELLOS, S. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; MORAIS, Z. M.; BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FERREIRA – NETO, J. S.; SCHOUBERG, A.; HARTSKEERL, R. A. Isolation of Leptospira Santarosai, serovar Guaricura from Buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 298-300, 2001.

VASCONCELLOS, S. A. Laboratory diagnosis of leptospirosis in animals. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE LEPTOSPIRA Y LEPTOSPIROSIS EN LAS AMERICAS. México, Divisões educacion continua de la Universidade Nacional Autônoma de México. 2004, México. **Anais…** v. 1, p. 70-76, 2004.

VIEGAS, S. A.; CALDAS, E. M.; OLIVEIRA, E. M. D. Aglutininas anti-leptospira em hemosoro de animais domésticos de diferentes espécies, no Estado da Bahia, 1997/1999. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, p. 1-6, 2001.

VIEGAS, S. A. R.; DÓRIA, J. D.; ROCHA, J. V. N.; RODRIGUES, F. M. Aglutininas antileptospiras em soro de bovinos no Estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v. 10, n. 1, p. 3-13, 1986

WHO.Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization.2003.

YANAGUITA, R. M. **Contribuição ao Estudo da Leptospirose bovina. Isolamento de dois novos sorotipos no sorogrupo Hebdomadis: sorotipos Guaicurus e Goiano**. 1972. 71 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo,1972.

.

YASUDA, P. H. STEINGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new Leptospira species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 407-415, 1987.

YASUDA, P. H., SAKATA, E. E., SHIKANAI-YASUDA, M. A., VASCONCELLOS, S. A., ROMERO, E. C., SILVA, M. V., CARRASCO, S. Avaliação da contraimunoeletroforese com antígenos dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Patoc no diagnóstico sorológico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 497-502, 1991.

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

ZUERNER, R. L.; ALT, D. P. Variable nucleotide tandem-repeat analysis revealing a unique group of *Leptospira interrogans* serovar Pomona isolates associated with california sean lions. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1202-1205, 2009.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Propriedades do Estado de **GOIÁS,** em que os bovinos foram submetidos ao teste da SAM aplicada a leptospirose, segundo o município de localização da propriedade, o código de identificação e o número de propriedades examinadas - São Paulo - 2009

Cidade	Código da propriedade
Jataí	7
Caçu	8
Itaberaí	9
Aporé	57
Mineiros	58
Mineiros	59
Mineiros	60
Itumbiara	76
Itumbiara	77
Itaberaí	78
Itaberaí	79
São Miguel do Araguaia	80
Itumbiara	81
Jussara	82
Santa Fé de Goiás	83
Morrinhos	84
Bom Jesus de Goiás	85
Morrinhos	86
Santa Fé de Goiás	87
Quirinópolis	109
Total de propriedades	20

APÊNDICE B - Propriedades do Estado do **MATO GROSSO,** em que os bovinos foram submetidos ao teste da SAM aplicada a leptospirose, segundo o município de localização da propriedade, o código de identificação e o número (nº) de propriedades examinadas - São Paulo - 2009

Cidade	Código da propriedade
Rondonópolis	18
Cáceres	19
Barra do Garças	20
Tangará da Serra	88
Cáceres	89
Cuiabá	90
Barra do Garças	91
Barra do Garças	92
Tapurah	93
Alta Floresta	94
Mirassol do Oeste	100
Número de propriedades	11

APÊNDICE C - Propriedades do Estado do **MATO GROSSO DO SUL**, em que os bovinos foram submetidos ao teste da SAM aplicada a leptospirose, segundo o município de localização da propriedade, o código de identificação e o número (nº) de propriedades examinadas - São Paulo - 2009

Cidade	Código da propriedade
Coxim	15
Miranda	26
Bodoquena	27
Aquidauana	68
Corumba	69
Água Clara	70
Juinhema	71
Coxim	72
Camapuã	73
Número de propriedades	9

APÊNDICE D - Propriedades do Estado de **MINAS GERAIS,** em que os bovinos foram submetidos ao teste da SAM aplicada a leptospirose, segundo o município de localização da propriedade, o código de identificação e o número (nº) de propriedades examinadas - São Paulo - 2009

Cidade	Código da propriedade
Buritizeiro	12
Governador Valadares	13
Canápolis	14
Itambacuri	16
Jaiba	17
Paracatu	25
Paracatu	28
Bom Despacho	29
Patrocínio	38
Paracatu	39
Paracatu	40
Patrocínio	41
Três Corações	42
Três Corações	43
Elói Mendes	44
Belo Horizonte	56
Conquista	61
Carneirinho	62
Natalândia	95
Presidente Olegário	96
Número de propriedades	20

APÊNDICE E - Propriedades do Estado do **PARANÁ**, em que os bovinos foram submetidos ao teste da SAM aplicada a leptospirose, segundo o município de localização da propriedade, o código de identificação e o número (nº) de animais examinados. São Paulo, 2009

Cidade	Código da propriedade
Campo Bonito	1
Cafeara	2
Porecatu	3
Rio Branco do Ivaí	4
Palmital	5
Congonhinhas	6
Londrina	10
Apucarana	11
Quedas de Iguaçu	21
Castro	45
Castro	46
Palmeira	47
Palmeira	48
Palmeira	49
Carambeí	50
Castro	51
Carambeí	52
Arapoti	53
Paranavaí	54
Campo Mourão	55
‘Número de propriedades	20

APÊNDICE F- Propriedades do Estado do **RIO GRANDE DO SUL**, em que os bovinos foram submetidos ao teste da SAM aplicada a leptospirose, segundo o município de localização da propriedade, o código de identificação e o número (nº) de propriedades examinadas. São Paulo, 2009

Cidade	Código da propriedade
Pelotas	102
Bagé	103
São Sepe	104
São Borja	105
São Borja	106
Uruguaiana	107
São Francisco de Assis	108
Número de propriedades	7

APÊNDICE G Propriedades do Estado de **SANTA CATARINA**, em que os bovinos foram submetidos ao teste da SAM aplicada a leptospirose, segundo o município de localização da propriedade, o código de identificação e o número (nº) de propriedades examinadas. São Paulo, 2009

Cidade	Código da propriedade
Antonio Carlos	97
Santiago do Sul	101
Número de propriedades	2

APÊNDICE H Propriedades do Estado de **SÃO PAULO,** em que os bovinos foram submetidos ao teste da SAM aplicada a leptospirose, segundo o município de localização da propriedade, o código de identificação e o número (nº) de propriedades examinadas. São Paulo, 2009.

Cidade	Código da propriedade
Descalvado	22
Mococa	23
Cravinhos	24
Avaí	30
Lins	31
Paranapuã	32
Val Paraíso	33
Euclides da Cunha	34
Colômbia	35
São Sebastião	36
Castilho	37
Presidente Venceslau	63
Martinópolis	64
Campinas	65
Presidente Venceslau	66
Santo Antonio da Alegria	67
Reginópolis	74
Jaú	75
Lins	98
Presidente Venceslau	99
Número de propriedades	20

APÊNDICE I - Sorovares de leptospira mais prováveis identificado em bovinos submetidos ao teste da SAM, com a coleção de 23 antígenos de referência, segundo o Estado de origem. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005 - São Paulo - 2009.

ESTADO / SOROVAR	Hardjo	Shermani	Wolffi	Grippotyphosa	Pomona	Autumnalis	Australis	Hebdomadis	Icterohaemorrhagiae	Pyrogenes	Castellonis
	Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência
Goiás	*367/765	140/765	63/765	43/765	37/765	24/765	24/765	6/765	14/765	15/765	2/765
Mato Grosso	157/474	84/474	81/474	42/474	30/474	21/474	13/474	5/474	3/474	21/474	3/474
Mato Grosso do Sul	194/437	112/437	70/437	11/437	0/474	6/437	12/437	11/437	8/437	7/437	2/437
Minas Gerais	349/708	131/708	56/708	68/708	27/708	13/708	13/708	16/708	6/708	5/708	2/708
Paraná	121/427	91/427	31/427	11/427	20/427	71/427	12/427	11/427	4/427	4/427	4/427
São Paulo	348/708	168/708	65/708	39/708	22/708	16/708	7/708	9/708	7/708	8/708	3/708
Santa Catarina	52/113	23/113	6/113	1/113	16/113	1/113	8/113	1/113	0/113	2/113	0/113
Rio Grande do Sul	80/244	26/244	14/244	3/244	14/244	9/244	35/244	3/244	5/244	13/244	20/244

* Número de animais reatores com título mais elevado para o sorovar pelo número de animais em que houve reação com título mais elevado para um sorovar. Os animais em que houve título mais elevado idêntico para dois ou mais sorovares foram eliminados desta análise.
SAM= microtécnica de soroaglutinação microscópica

APÊNDICE J Sorovares de leptospira mais prováveis identificado em bovinos submetidos ao teste da SAM, com a coleção de 23 sorovares de referência mais dez estirpes isoladas no Brasil, segundo o Estado de origem. Colheitas efetuadas de março de 2004 a maio de 2005. São Paulo, 2009

ESTADO / SOROVAR	Hardjo	Shermani	Wolffi	Grippotyphosa	Pomona	Autumnalis	Australis	Castellonis	Guaricura	Pomona (M7/87)	Canicola (LO14)	Canicola (LO4)	Canicola (LO1)
Goiás	*332/824	122/824	44/824	33/824	27/824	19/824	23/824	2/824	73/824	12/824	60/824	19/824	1/824
Mato Grosso	101/653	65/653	27/653	33/653	18/653	15/653	4/653	1/653	317/653	2/653	19/653	21/653	1/653
Mato Grosso do Sul	151/531	89/531	19/531	4/531	0/531	5/531	7/531	1/531	188/531	0/531	6/531	7/531	12/531
Minas Gerais	290/748	124/748	43/748	49/748	20/748	10/748	4/748	2/748	107/748	29/748	15/748	3/748	2/748
Paraná	117/454	88/454	26/454	11/454	9/454	68/454	13/454	3/454	33/454	10/454	4/454	3/454	0/454
São Paulo	253/816	143/816	34/816	30/816	6/816	15/816	5/816	4/816	249/816	24/816	12/816	2/816	5/816
Santa Catarina	51/109	23/109	5/109	0/109	12/109	1/109	8/109	0/109	1/109	0/109	1/109	0/109	0/109
Rio Grande do Sul	65/253	23/253	11/253	3/253	13/253	9/253	36/253	19/253	18/253	4/253	5/253	12/253	0/253

* Número de animais reatores com título mais elevado para o sorovar pelo número de animais em que houve reação com título mais elevado para um sorovar. Os animais em que houve título mais elevado idêntico para dois ou mais sorovares foram eliminados desta análise.
SAM= microtécncica soroaglutinação microscópica

ANEXO

ANEXO A - Tamanho da amostra para detectar uma porcentagem de (1-50%) de reatores em população de diferentes tamanhos e probabilidade de 99%

Tamanho do rebanho	Prevalência (%), ou porcentagem máxima permitida de reatores no grupo									
	1%	2%	3%	4%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
100	99	90	78	68	59	36	19	13	9	7
200	180	136	106	86	73	40	20	13	9	7
300	235	160	119	94	78	41	20	13	9	7
400	273	160	119	94	78	41	20	13	9	7
500	300	183	131	190	83	42	21	13	9	7
1000	368	204	141	107	86	43	21	13	9	7
5000	438	223	149	112	89	44	21	13	9	7
Infinito	459	228	152	113	90	44	21	13	9	7

Segundo a fórmula: * Probabilidade (%) = $(1- x)^n$, onde o x= prevalência e o n= tamanho da amostra testada para populações infinitas (FAINE, 1982)

ANEXO B – FÓRMULA DO TESTE DE MCNEMAR (LATORRE, 2008)

Teste de McNemar , utilizado quando a variável é qualitativa dicotômica
A amostra é a mudança

	Antes	
Depois	**Negativo**	**Positivo**
Positivo	**a**	**b**
Negativo	**c**	**d**
	a + c	**b + d**

Ho: os indivíduos "não mudaram"

Há: os indivíduos "mudaram"

mudança: a e d

não mudança: b e c

$X^2 = \frac{\sum(O-E)^2}{E}$, **considerando número de moficações "esperadas": 1/2 (a + d)**

$X^2 = \frac{(|a-d|-1)^2}{a+d}$, ≈ X^2 ***com 1 grau de liberdade*,**
com correção de continuidade (Yates)