

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

ADRIANA PRAZERES PAIXÃO

***LEPTOSPIRA* spp EM REBANHOS BOVINOS DAS BACIAS LEITEIRAS DAS
REGIÕES CENTRAL E NORDESTE DO ESTADO DO MARANHÃO-BRASIL:**
frequência, fatores de risco e mapeamento de focos

São Luís-MA

2014

ADRIANA PRAZERES PAIXÃO

***LEPTOSPIRA* spp EM REBANHOS BOVINOS DAS BACIAS LEITEIRAS DAS
REGIÕES CENTRAL E NORDESTE DO ESTADO DO MARANHÃO-BRASIL:**

frequência, fatores de risco e mapeamento de focos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

Área de concentração: Defesa Sanitária Animal

Orientador: Prof. DSc. Hamilton Pereira Santos

São Luís-MA

2014

Paixão, Adriana Prazeres

Leptospira spp. em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão-Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de focos/Adriana Prazeres Paixão. – São Luis, 2014.

102f.

Orientador: Prof. DSc. Hamilton Pereira Santos.

Dissertação (Mestrado) – Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal. Universidade Estadual do Maranhão, 2014.

1. Leptospirose. 2. Bovinos leiteiros. 3. Epidemiologia. 4. Maranhão.
5. Soroaglutinação Microscópica I.Título.

CDU:636.2.034:616.993 (812.1)

ADRIANA PRAZERES PAIXÃO

***LEPTOSPIRA* spp EM REBANHOS BOVINOS DAS BACIAS LEITEIRAS DAS
REGIÕES CENTRAL E NORDESTE DO ESTADO DO MARANHÃO-BRASIL:**
frequência, fatores de risco e mapeamento de focos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof.º DSc. Hamilton Pereira Santos
Orientador

Prof.ª. DSc. Lúcia Maria Coêlho Alves
1º Membro

Prof.º DSc. Hélder de Moraes Pereira
2º Membro

Dedico este trabalho à minha mãe Ilka Maria Prazeres Paixão (in memoriam), por sua dedicação profissional, grande exemplo! A minha filha, Julianna Paixão Kusano Robattini, meu pilar, és tudo! Ao meu afilhado Rodolfo Gabriel Prazeres Silva Lopes, pelo amor e carinho dedicado e, aos meus tios Ítalo Prazeres Silva e Maria do Carmo Prazeres Silva, responsáveis pela educação obtida, fator indispensável para minha formação pessoal e profissional.
Obrigada pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A DEUS

*“Eu pedi força e Deus me deu dificuldades
para me fazer forte. Pedi sabedoria e Deus
me deu problemas para resolver. Pedi coragem e
Deus me deu perigos para superar. Pedi
amor e Deus me deu pessoas para ajudar.
Eu não recebi nada do que pedi... Mas
recebi tudo que precisava, a VIDA!”*

(Autor desconhecido)

Ao meu Orientador, Prof. DSc. Hamilton Pereira Santos, pela confiança, incentivo, amizade e valores repassados, sempre de forma humilde e paciente. Serei eternamente grata!

À Prof^ª. DSc. Lúcia Maria Coêlho Alves, pela força e acolhimento.

Aos Coordenadores do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal, Prof^ª. DSc. Francisca Neide Costa e o Prof^º. DSc. Daniel Praseres Chaves, pelo comprometimento na consolidação desta Pós-graduação.

Ao Dr. Oswaldo Serra Pinto, presidente do Fundo de Desenvolvimento da Pecuária do estado do Maranhão, pelo apoio fundamental para caminhada deste Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), pelo auxílio financeiro para a execução desta pesquisa.

À Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão (AGED/MA), na pessoa do Dr. Fernando Luís Mendonça Lima (Diretor Geral), Dra. Margarida Paula Prazeres de Sá (Diretora de Defesa e Inspeção Animal) e o Dr. Lauro de Queiroz Saraiva (Coordenador de Defesa Animal), pela compreensão e liberação para o desenvolvimento deste estudo.

A todos os professores do Programa e aos professores convidados, Clóvis Improta, Luís Antônio Mathias, Náder Filho e Raimundo Rabelo, pela contribuição quanto ao meu crescimento profissional.

Aos Professores DSc. Ferdinan Almeida Melo e Hélder de Moraes Pereira, pelo incentivo, sempre!

À Ynady Ferreira Costa e Tânia Maria Duarte Silva, simplesmente...pela verdadeira amizade!

Aos colegas da turma, em especial Efigênia Magda, Sonivalde Santana, Hugo Napoleão, pelos momentos de alegria.

Aos chefes e colegas das Unidades Regionais da AGED/MA, de Bacabal (Tatiana Dias de Carvalho, Luís Pereira Lima Filho, Cosmo C. da Silva, Herton V. Galiza, Ademir P. Sales dos Santos, Audenice A. da Silva e Manoel Cardoso de Sousa), Pedreiras (Robert Ferreira Barroso de Carvalho, Valter Marchão Costa Filho, Kleyton S. Sales, Kelly S. Sales Valério, Francisco C. de Sousa, Edmilson B. Lima e James Cláudio) e São Luís (Benito Pereira da Silva, Anelilde S. Ramalho e Flabriso Henrique V. da Silva), que contribuíram, de forma ímpar, na etapa de colheita das amostras.

Ao Grupo de Estudos e Pesquisa de Ruminantes Domésticos, em especial, Emerson Araújo, Priscila Alencar, Diego Moraes, Glenda Barros e Jéssica L. Albuquerque, pelo carinho e dedicação na etapa laboratorial e momentos de dificuldades.

À Nancylene Pinto Chaves, pela colaboração nas análises estatísticas e sugestões valiosas.

A Danner Silva, pela confecção dos mapas de georreferenciamento.

À Naia Alves, pela elaboração do abstract.

À Darcy pelo profissionalismo dedicado à normalização desta dissertação.

A Roberto Carlos Negreiros de Arruda (Fiscal Federal Agropecuário/MA) e Felipe Jorge da Silva (Médico Veterinário/Jaboticabal-SP), pela contribuição ao envio de referências bibliográficas.

Aos criadores, pela confiança e permissão para realização das colheitas das amostras dos animais e a estes, que sem sua existência nada teria se concretizado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta importante pesquisa.

Muito obrigada!

*O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e humildade.”*

(Cora Coralina)

RESUMO

PAIXÃO, A. P. ***Leptospira* spp em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão-Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de focos.** [*Leptospira* spp in dairy cattle herds from the Regions Middle and Northeast the state of Maranhão-Brasil: frequency, risk factors and mapping outbreaks]. 2014. (102f.) Dissertação (Mestrado em Defesa Sanitária Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2014.

O presente estudo teve como objetivo determinar a frequência, os fatores de risco e mapeamento de focos em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão, Brasil, associados à *Leptospira* spp. Foram colhidas 420 amostras de soros sanguíneos de fêmeas com idade ≥ 24 meses, selecionadas de forma aleatória simples, distribuídas em 70 rebanhos, provenientes de 14 municípios (Bacabal, Bom Lugar, Lago Verde, Olho d'Água das Cunhãs, São Luís Gonzaga, Vitorino Freire, Bernardo do Mearim, Igarapé Grande, Pedreiras, Trizidela do Vale, Lima Campos, Poção de Pedra, Lago da Pedra e São Luís). Foi aplicado um questionário epidemiológico para investigar os principais fatores de riscos associados à infecção. As amostras de soro foram submetidas à prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), sendo utilizados 24 sorovares do complexo anti-*Leptospira* spp. Das amostras analisadas, 70 (100%) para rebanhos e 420 (100%) para animais foram reagentes a pelo menos um dos sorovares anti-*Leptospira* spp com títulos variáveis entre 100 a 800. Os sorovares mais prevalentes foram Patoc 410/420 (97%), Castellonis 351/420 (84%), Hardjo 347/420 (83%), Hebdomadis 335/420 (80%), Wolffi 330/420 (79%), Sentot 328/420 (78%), Autumnalis 322/420 (76%), 322/420 (76%) Butembo, Brastilava 298/420 (71%), Icterohemorrhagiae 300/420 (71%), Pomona 286/420 (69%) e Andamana 286/420 (68%). Das variáveis consideradas fatores de risco, a realização de inseminação artificial; criação conjunta de caprinos, ovinos, equinos e caninos nas propriedades e maior taxa de nascimento de bezerros no período seco, apresentaram associação estatística significativa ($P < 0,05$) à ocorrência da infecção por *Leptospira interrogans*. Os resultados demonstram níveis elevados de frequência da leptospirose no rebanho bovino leiteiro das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão. Estes resultados indicam a necessidade de implementação de estratégias, que consistem na realização de vacinações e exames sorológicos, aquisição de animais de propriedades idôneas, efetivação de quarentena ao ingresso de novos animais, monitoramento dos rebanhos existentes nas propriedades, notificação da doença junto à Agência de Defesa do Estado, além da adoção de medidas de biossegurança.

Palavras-chave: Leptospirose, bovinos leiteiros, epidemiologia, Maranhão, soroaglutinação microscópica.

ABSTRACT

PAIXÃO, A. P. ***Leptospira* spp in dairy cattle herds from the Regions Middle and Northeast the state of Maranhão-Brasil: frequency, risk factors and mapping outbreaks.** [*Leptospira* spp em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão-Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de focos]. 2014. (102f.) MsC thesis (Master in Animal Health) – Maranhão State University, São Luís, 2014.

The presente study's aim was to determine frequency, risk factors and mapping outbreaks in dairy cattle herds from the Regions Middle and Northeast the state in Maranhão, Brasil, associated to *Leptospira* spp. Were analyzed 420 samples of blood serum from females, age ≥ 24 months, selected in a random way, distributed in 70 herds, from 14 townships (Bacabal, Bom Lugar, Lago Verde, Olho d'Água das Cunhãs, São Luís Gonzaga, Vitorino Freire, Bernardo do Mearim, Igarapé Grande, Pedreiras, Trizidela do Vale, Lima Campos, Poção de Pedra, Lago da Pedra and São Luís). An epidemiological questionnaire was applied to investigate possible factors that could have been associated to the infection. Serum samples were submitted to the Serum Agglutination Test (SAT). It was used 24 serovars from the anti-*Leptospira* spp complex. From the analyzed samples, 70 (100%) for herds and 420 (100%) for animals, were reagent to at least one of the anti-*Leptospira* spp. serovar, reaching titles between a 100 and 800. The most prevalent serovars were Patoc 410/420 (97%), Castellonis 351/420 (84%), Hardjo 347/420 (83%), Hebdomadis 335/420 (80%), Wolffii 330/420 (79%), Sentot 328/420 (78%), Autumnalis 321/420 (76%), Butembo 322/420 (76%), Brastilava 298/420 (71%), Icterohemorrhagiae 300/420 (71%), Pomona 286/420 (69%) and Andamana 286/420 (68%). From the variables considered as risk factors, the utilization of artificial insemination, mixed herds of goats, sheeps, equines and canines in the properties and the birth of calves in the non rainy period showed significant statistical association ($P < 0,05$) to the risk of infection with *Leptospira interrogans*. The results show elevated levels of Leptospirosis frequency in dairy cattle herd the Regions Middle and Northeast in Maranhão state. Therefore, there is a necessity to implement strategies, consisting of vaccinations and serological exams, acquisition of animals from reputable properties, establishment of quarantine for arrival of new animals, monitoring existent herds in the properties, notification of the disease to the State Animal Health Agency, besides the adoption of biosecurity measures.

Key-words: Leptospirosis, dairy cattle, epidemiology, Maranhão, microscopic serum agglutination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Mapa das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, MA, Brasil, 2014	40
Figura 2-	Distribuição espacial de focos de leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros da Unidade Regional de Bacabal, MA, Brasil, 2014	49
Figura 3-	Distribuição espacial de focos de leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros da Unidade Regional de Pedreiras, MA, Brasil, 2014	50
Figura 4-	Distribuição espacial de focos de leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros da Unidade Regional de São Luís, MA, Brasil, 2014	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição das Unidades Regionais com seus respectivos municípios, número de rebanhos e amostras, Maranhão, Brasil, 2014.....	42
Tabela 2-	Coleção de antígenos do complexo <i>Leptospira</i> spp de referência utilizados na prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), segundo espécie, sorogrupo e sorovar, 2014.....	44
Tabela 3-	Frequência de aglutininas anti- <i>Leptospira</i> spp identificadas em rebanhos e animais das bacias leiteiras das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014.....	48
Tabela 4-	Frequência de sorovares anti- <i>Leptospira</i> spp diagnosticados em fêmeas bovinas das bacias leiteiras das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014.....	52
Tabela 5-	Títulos aglutinantes anti- <i>Leptospira</i> observados em soro sanguíneo de fêmeas bovinas das bacias leiteiras das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014.....	53
Tabela 6-	Frequência dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona identificados em rebanhos leiteiros, das bacias das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014.....	54
Tabela 7-	Frequência dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona em fêmeas bovinas, das bacias leiteiras, das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014	55
Tabela 8-	Frequência dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona diagnosticados no exame de Leptospirose realizado em rebanhos bovinos, das bacias leiteiras, por município, das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014.....	56
Tabela 9-	Frequência dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona diagnosticados no exame de Leptospirose realizado em fêmeas bovinas, das bacias leiteiras, por município das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014	57
Tabela 10-	Análise univariada dos fatores de riscos associados à infecção pelos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona, em rebanhos bovinos, das bacias leiteiras, das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AGED/MA	Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão
COLISEU	Companhia de Lixo e Serviços Urbanos
CMT	Califórnia Mastist Test
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMJH	Ellighausen, Mc Cullough, Johnson e Harris
EUA	Estados Unidos da América
GPS	<i>Global Position System</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHQ	Imunohistoquímica
IN	Instrução Normativa
LAMBET/MA	Laboratório de Meteorologia do Estado do Maranhão
LCR	Líquido Céfalorraquidiano
LPS	Lipossacarídeos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ration</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
RIFI	Imunofluorescência Indireta
SAM	Soroaglutinação Microscópica
SAR	Soroaglutinação Rápida
UR	Unidade Regional
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
°C	Graus Celsius
Z	Grau de confiança
IC	Intervalo de confiança
>	Maior
≥	Maior ou igual
D	Margem de erro
-	Menos
Mm	Micrômetro
mg/Kg	Miligrama por quilo
mL	Mililitro
'	Minuto
Z	Nível de confiança
N	Número de amostras
OR	<i>Odds Ration</i>
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogênico
P	Prevalência
P	Prevalência esperada
X ²	Qui-quadrado
Km ²	Quilometro quadrado
“	Segundo
P	Significância estatística
G	Ultracentrifugação
X	Vezes

SUMÁRIO

	RESUMO	x
	ABSTRACT	xi
	LISTA DE FIGURAS	xii
	LISTA DE TABELAS	xiii
	LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
	LISTA DE SÍMBOLOS	xv
1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	Aspectos históricos	21
3.2	Taxonomia e morfologia	22
3.3	Epidemiologia	23
3.3.1	Situação da leptospirose bovina no Mundo	25
3.3.2	Situação da leptospirose bovina no Brasil	26
3.3.3	Situação da leptospirose no Maranhão	27
3.4	Cadeia de transmissão	29
3.5	Patogenia	30
3.6	Imunidade	31
3.7	Sinais clínicos	32
3.8	Diagnóstico	33
3.8.1	Métodos diretos	34
3.8.2	Métodos indiretos	35
3.9	Controle	36
3.10	Tratamento	37
3.11	Importância econômica	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Área de estudo	39
4.2	Amostragem	40

4.3	Seleção dos rebanhos e animais	41
4.4	Colheita das amostras	42
4.5	Aplicação do questionário epidemiológico	43
4.6	Georreferenciamento dos dados e das propriedades	43
4.7	Técnica sorológica	44
4.8	Preparo do antígeno	45
4.9	Realização e interpretação da Técnica de SAM.....	46
4.10	Análise dos dados.....	46
5	RESULTADOS	48
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	70
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	
	APÊNDICES	
	ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos principais rebanhos bovinos comerciais do mundo, com aproximadamente 209 milhões de cabeças e apresenta-se como um dos grandes esteios da economia do país, com avanços nos índices de produção, com destaque para a produtividade e para a exportação de seus produtos (IBGE, 2014).

A atividade agropecuária mostra-se relevante para o aumento da geração de riqueza e crescimento do Produto Interno Bruto (PIB) do país (IBGE, 2012). Por outro lado, a produção de leite nos últimos 25 anos aumentou 150%, passando de 8 bilhões de litros no ano de 1975 para 20 bilhões no ano 2000, ultrapassando 26 bilhões em 2007. O Brasil é um dos principais países produtores de leite e ocupa a 5ª posição com 31.667.600 toneladas da produção mundial de acordo com a classificação global dos principais países produtores de leite (EMBRAPA, 2012).

Quanto ao estado do Maranhão, este possui o segundo maior rebanho bovino da Região Nordeste e esta exploração é a principal atividade econômica do setor pecuário do estado, com um total de 7.272.822 de cabeças de bovídeos, sendo 790 mil de rebanho leiteiro (AGED/MA, 2012). No ranking de produção de leite no Brasil, a Unidade Federativa do Maranhão ocupa o 16º lugar com a produção de 336 milhões de litros por ano, 642 litros/vaca e 55 litros por habitante (IBGE, 2012).

Vale ressaltar que, a bovinocultura leiteira do estado encontra-se em expansão, principalmente, impulsionada pelos investimentos na indústria de laticínios, em tecnologia e genética para melhoramento do rebanho, o que contribui com a elevação do percentual de emprego e renda (ACM, 2013). Atualmente a matéria-prima produzida nas bacias leiteiras está voltada para as indústrias processadoras, com destino a um centro de consumo (OLIVEIRA; SILVA, 2012). Também o reconhecimento internacional de zona livre de febre aftosa com vacinação habilita a bovinocultura do Maranhão a ampliar o comércio referente ao setor de carne, bem como, o de leite e derivados, com países de outras fronteiras (BRASIL, 2014).

Negrão et al. (2000) afirmam que o sucesso da cadeia da bovinocultura está relacionado ao desempenho reprodutivo do rebanho, pois, entraves como a ausência de controle sanitário adequado contribui para o surgimento de doenças,

com ênfase na exploração leiteira, entre estas enfermidades destaca-se a leptospirose.

A leptospirose é uma antropozoonose bacteriana, de elevada prevalência, cosmopolita, diagnosticada em países de clima tropical e subtropical, principalmente nos períodos de altos índices pluviométricos. Acomete os animais domésticos, silvestres, roedores sinantrópicos e o homem (ACHA; SZYFRES, 2003; CORCHO, 2008; OIE, 2014).

Do ponto de vista de Saúde Pública, está relacionada às problemáticas de condições de infraestrutura sanitária, o que reflete na baixa condição socioeconômica do país (BRASIL, 2005). A enfermidade afeta determinados segmentos profissionais, como médicos veterinários, laboratoristas, garis, agricultores, trabalhadores de abatedouros e tratadores de animais, devido contato estreito com as fontes de infecção (ACHA; SZYFRES, 2003; PIRES, 2010).

Os impactos negativos da leptospirose refletem-se economicamente, devido aos prejuízos decorrentes de abortamentos em torno de 12 a 68,4% em rebanhos não vacinados, natimortos, flacidez de úbere, à diminuição da produção láctea, redução da taxa de concepção e de infertilidade em 47% e o alto custo com o tratamento, tendo em vista à sua transmissão às diversas espécies animais de produção (PIRES, 2010).

É uma enfermidade que consta na lista múltipla de espécies do Código Sanitário para Animais Terrestres da Organização Internacional de Epizootias por ser emergente, difundir-se em diversas nações e ter consequência na comercialização internacional de animais, produtos e subprodutos (OIE, 2009). De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 50 de 24 de setembro de 2013, do MAPA, a leptospirose deve ser notificada, por meio de Médicos Veterinários Privados, Habilitados e Responsáveis Técnicos (RT's), junto às Agências de Defesa Sanitária Animal (BRASIL, 2013).

Considerando a abertura de mercados no segmento de laticínios no Estado, associado à importância socioeconômica que a leptospirose representa, aliado às práticas deficientes de sanidade nas propriedades e a carência de dados soro-epidemiológicos da ocorrência desta enfermidade em rebanhos bovinos de aptidão leiteira no Estado do Maranhão, é que este trabalho foi realizado com os objetivos propostos a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar estudo sobre a frequência, fatores de risco, sorovares predominantes e mapeamento de focos de *Leptospira* spp em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão, Brasil.

2.2 Específicos

- Estimar a frequência da leptospirose em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão, Brasil;
- Identificar os sorovares do complexo *Leptospira* spp em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão, Brasil;
- Avaliar possíveis fatores de riscos, associados à ocorrência da leptospirose em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão, Brasil;
- Mapear focos da leptospirose em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regiões Central e Nordeste do Estado do Maranhão, Brasil.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos históricos

A leptospirose foi descoberta em 1800, no Cairo, por Larrey, médico militar francês, que observou no exército napoleônico dois casos de icterícia infecciosa, a qual foi descrita em 1881, por Weiss, em Praga, como uma doença que provocava icterícia no homem "*Icterus catarrhalis*", e que posteriormente foi denominada doença de Weil (CACCHIONE, 1962).

Em 1886, Adolf Weil, em Heidelberg, na Alemanha, oficializou a primeira descrição da leptospirose humana como uma doença que causava uma síndrome icterica severa, febre, hemorragia e falência renal, a partir deste aspecto, a enfermidade passou a ter o nome de doença de Weill; conhecida ainda como "Tifo bilioso ou icterícia infecciosa" (CACCHIONE, 1962; LEVETT, 2001). Na China a leptospirose era referenciada como "icterícia da colheita do arroz ou icterícia arrozal" e no Japão "febre dos sete dias de outono" (FAINE et al., 2000).

Em 1891, F. Miller, em Schleisen, descreveu uma doença com sintomatologia e sinais similares, caracterizando-a de "*Sclamfiebrer epidemie*" e Rimpau relatou "*Feldfiebrer*", leptospirose não icterica (CACCHIONE, 1962).

Em 1907, nos Estados Unidos da América, Stimson observou o agente em cortes histológicos de rim de paciente diagnosticado com febre amarela. As bactérias apresentavam uma forma similar ao ponto de interrogação e se encontravam em conjunto, sendo então denominadas "*Spirochaeta interrogans*" (CACCHIONE, 1962; FAINE et al., 2000).

No Japão, em 1915, Inada e Ito isolaram a leptospira em trabalhadores de minas denominando-a "*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*", e no mesmo ano, Uhlenhut e Fromme realizaram o primeiro isolamento em cobaia inoculada com sangue de soldados doentes. Em 1917, Miyajima, também neste país, demonstrou que os ratos são vetores da doença em humanos (CACCHIONE, 1962).

Em bovinos, o primeiro relato de leptospirose, foi em Cáucaso, na Rússia, por Mikhin e Azhino, em 1935, através do isolamento de *Leptospiras* spp em bezerros, com sinais de hemoglobinúria infecciosa aguda (YANAGAWA et al., 1955).

No Brasil, a leptospirose foi constatada, primeiramente no Estado do Pará, por McDowell (1917), após diagnóstico clínico da enfermidade precedido de

um surto. A identificação de *Leptospira icterohaemorrhagiae* foi diagnosticada no mesmo ano, por Aragão, em estudo realizado em seis *Rattus norvegicus*, na cidade do Rio de Janeiro (BRASIL, 1995).

Em bovinos, Freitas et al. (1957) efetuaram o primeiro isolamento de *Leptospira* spp, classificada como Pomona. Também Santa Rosa et al. (1970) isolaram uma estirpe do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, em bovinos, no estado de São Paulo e, Yanaguita (1972) ao examinar quinhentos bovinos em matadouro, isolou duas estirpes de *Leptospira* spp, classificadas como novos sorovares do sorogrupo Hebdomadis: *L. guaicuris* e *L. goiano* (VASCONCELLOS et al., 2001).

3.2 Taxonomia e morfologia

A leptospirose é uma enfermidade infecto-contagiosa causada por *Leptospira interrogans*. As Leptospiras pertencem à classe *Eubacteriales*, ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (FAINE, 1999; HAMOND, 2010; EUZÉBY, 2014).

Até 1989, as Leptospiras estavam divididas em duas espécies, de acordo com critérios antigênicos: *L. interrogans*, da qual faziam parte todas as cepas patogênicas, e *L. biflexa*, incluindo cepas saprófitas. Contudo, estudos de características genéticas conduziram a várias espécies dentro de *Interrogans lato sensu*: *L. interrogans sensu stricto*; *L. santarosai*; *L. weilii*; *L. inadai*; *L. wolbachii*; *L. borgpetersenii*; *L. kirschneri*; *L. meyeri*, *L. noguchii*, onde os sorovares patogênicos e saprófitas poderiam se encaixar dentro de uma mesma espécie (MINEIRO et al., 2007).

No Equador, em 2007 em uma reunião do Subcomitê de Taxonomia da *Leptospiraceae*, a *L. interrogans* foi reclassificada com 13 espécies de *Leptospiras*: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffi*, distribuídas em mais de 260 sorovariedades e agrupadas em 23 sorogrupos (EUZÉBY, 2013).

Já a *Leptospira biflexa* possui 3 espécies: *L. biflexa*, *L. wolbachii* e *L. hollandia* e 38 sorovares agrupados em 6 sorogrupos (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; GOMES, 2013; EUZÉBY, 2014). São saprófitas, de vida livre, encontradas em diversos tipos de ambientes líquidos, como águas salinas e superficiais (BHARTI et

al., 2003; OMS, 2008; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; BROOKS et al., 2010; HAMOND, 2010; GOMES, 2013).

No ano de 2013, foram incluídas mais quatro genomo espécies de acordo com a *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, instituída pelo pesquisador Jean Paul Euzéby e mantida por Aidan C. Parte, permanecendo a sua classificação da seguinte forma: *L. interrogans* (espécie tipo do gênero), *L. biflexa*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. fainei*, *L. alexanderi*, *L. broomii*, *L. wolffii*, *L. kmetyi*, *L. licerasiae*, *L. alstonii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae*, *L. idonii*, *L. vanthielii* (EUZÉBY, 2014; GOMES, 2014).

São bactérias com diâmetro de aproximadamente 0,1 a 0,2 µm por 6-20 µm de comprimento, com forma de espiroquetas espiraladas, móveis, aeróbias, não capsuladas nem esporuladas, com gancho característico terminal em uma ou ambas as extremidades. Apresentam movimentos de saca rolha (spin), bem como de flexão-extensão e são facilmente visualizadas por microscopia de campo escuro (FAINE, 1999; AVELAR; PEREIRA, 2005; SANTOS et al., 2008). Como fonte de carbono e energia, utilizam ácidos graxos, vitaminas B1 e B12, ferro ferroso e íons de amônio (FAINE, 1999; SLACK et al., 2006; SANTOS et al., 2008).

As *Leptospiras* possuem em geral uma típica estrutura de membrana fina dupla, na qual são ligadas e revestidas por uma membrana externa, responsável pela conexão entre o meio exterior e a célula, com finalidade de barreira seletiva. Os lipopolissacarídeos da parede celular (LPS) das *Leptospira* spp são constituídos de forma similar ao de outras bactérias Gram negativas, no entanto, com atividade endotóxica reduzida (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001).

3.3 Epidemiologia

A leptospirose é epidemiologicamente bem definida, apresenta ampla distribuição geográfica e está associada às condições edafoclimáticas (HAMOND, 2010; MARTINS et al., 2012). A taxa de morbidade para a doença clínica é alta e pode atingir 100% dos animais, enquanto que, a taxa de letalidade é baixa, em torno de 5%, porém, em bezerros a mortalidade é maior do que em animais adultos (GÓMEZ, 2008).

Os níveis de ocorrência são elevados em regiões de clima tropical e subtropical, como na América Latina, África e Ásia. O período chuvoso impede a evaporação da urina contendo *Leptospira* expelida de animais infectados, o que pode ocasionar o aumento da incidência da doença (VASCONCELLOS, 2004). A manutenção de *Leptospiras* nas regiões urbanas e rurais do Brasil é favorecida além do clima, por condições sócio-econômico-culturais. O crescimento das cidades sem planejamento e o excesso de lixo acumulado sobre vias e áreas desprotegidas propiciam a proliferação de roedores, o que favorece a persistência e disseminação da infecção (BRASIL, 1995; BEZERRA et al., 2010).

É uma enfermidade que acomete 160 espécies de mamíferos domésticos e silvestres aproximadamente (JONES et al., 2000). Os diferentes sorovares de *L. interrogans* não apresentam especificidade de hospedeiro, porém, é observada a preferência de certos sorovares por determinados vertebrados. Estas condições configuram-se nas associações estabelecidas entre o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) e o sorovar Icterohaemorrhagiae, tendo como hospedeiro susceptível o homem; o cão doméstico com o sorovar Canicola; o suíno com o sorovar Pomona; os equinos com o sorovar Bratislava, os ovinos com os sorovares Icterohaemorrhagiae e Hebdomadis, entretanto há evidência que esta espécie seja hospedeira de manutenção do sorovar Hardjo; os caprinos com os sorovares Icterohaemorrhagiae, Castellonis e Grippotyphosa e os bovinos, com os sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona (FAINE, 1994; GENOVÉZ, 2009).

De acordo com Santa Rosa et al. (1975;1980), as sorovariedades relacionadas aos animais silvestres são: Patoc, Shermani, Hebdomadis, Autumnalis, Pyrogenes, Australis, Castellonis, Sentot e Andamana. Em cutias (*Dasyprocta spp.*), a sorovariedade predominante é a Castellonis. Em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), as sorovariedades Hardjo, Pomona e Grippotyphosa são as mais verificadas e entre os marsupiais, os gambás (*Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita*, *Didelphis marsupialis*) são reservatórios de sorovariedades, como Ballum, Bataviae, Icterohaemorrhagiae, Szwajizam e Grippotyphosa (CUBAS et al., 2007).

3. 3.1 Situação da leptospirose bovina no mundo

A leptospirose é considerada como enfermidade reemergente, principalmente nos países da América Central e do Sul, da África, países Asiáticos e Europeus (LEVETT, 2001; PALANIAPPAN et al., 2007; HARTSKELL, 2009).

Gaumont e Trap (1986) ao realizarem inquéritos epidemiológicos na França, obtiveram (2,8%) de bovinos sororeagentes para *Leptospira* spp e Pritchard, no mesmo ano, encontrou (34,4%) na Grã Bretânia. Na África, Wanyangu et al. (1987) constataram no Quênia, (15,5%) de búfalos selvagens (*Syncerus caffer*) reagentes, sendo mais frequente nesta espécie os sorovares Icterohemorrhagiae e Canicola e, na Região Sul, Myburgh et al. (1990) observaram também na mesma espécie (1,7%) sororeagentes aos sorovares Tarassovi e Hardjo.

Na Ásia, no distrito de Shekhupura (Paquistão), Chaudhry et al. (1996) verificaram que (16%) das amostras de soro sanguíneo de búfalos (*Bubalus bubalis*) reagiram contra os sorovares Icterohaemorrhagiae e Mini. Espí et al. (2000) encontraram na Região Sul da Espanha (10,4%), sendo as sorovariedades mais prevalentes em bovinos Pomona e Grippothyphosa. Também Alonso-Andicoberry et al. (2001) em León, na Espanha ao estudarem em bovinos a soroprevalência e fatores de risco associados à *Leptospira*, obtiveram (43%) e (8%), para rebanhos e animais, respectivamente, com frequência de (24%) para a variante sorológica Brastilava.

Com o objetivo de detectar sorovariantes de *Leptospira* spp, Álvarez et al. (2005), no México, analisaram 4.779 amostras de soro bovino e diagnosticaram prevalência de (50%), com (86%) para Hardjo e (78%) para Wolffi. Na Província de Corrientes, Argentina, Jacobo et al. (2009) avaliaram 550 amostras de soro bubalino e obtiveram os sorovares Tarassovi e Wolffi como os mais frequentes, considerados incomuns nessa localidade, onde havia relatos apenas dos sorovares Hardjo, Pomona, Grippothyphosa e Ballum.

Ao pesquisarem a frequência de aglutininas anti-*Leptospira* spp em espécie bovina, na Região de Camarões, Scolamacchia et al. (2010) encontraram prevalências de (95%) para rebanho e (35%) para animais. A enfermidade foi considerada endêmica por Schoonman e Swai (2010), em Tanga, Tanzânia, ao testarem 198 bovinos, cujos sorovares Hardjo (46,5%) e Tarassovi (40,4%) foram os mais frequentes. Em Sarab no Irã, Dadkhah e Yeganehzad (2011) avaliaram a

infecção por *Leptospira interrogans* em 200 bovinos leiteiros e constataram (23%) das amostras soro positivas.

No ano de 2013, estudos sorológicos realizados por Vakili et al. na cidade de Mianeh, Irã, em 210 bovinos, detectaram leptospirose (7,14%) com predominância para o sorovar Pomona (40%). Hurtado et al. (2013), na Colômbia, registraram em bovinos 47/137 (34,3%) com maior prevalência para o sorovar Grippotyphosa (29,85%) e Hardjo (20,8%). Já Roqueplo et al. (2013), na Nova Caledônia, obtiveram (43%) de animais soro positivos.

Gamage et al. (2014) observaram na espécie bovina que a frequência de aglutininas anti-*Leptospira* spp, no Sri Lanka, foi de 20/164 (12,2%) para animais. No Chile, Salgado et al. (2014) ao estudarem a prevalência de *Leptospira* spp obtiveram 52/69 (75%) para rebanhos e 320/1537 (21%) de animais reagentes, respectivamente.

3.3.2 Situação da leptospirose bovina no Brasil

As primeiras pesquisas sobre a leptospirose no país ocorreram no final dos anos 50, a partir dos relatos de Freitas et al. (1957), no estado de São Paulo, que identificaram a existência da infecção pelo sorotipo *L. pomona* em feto abortado.

Lilenbaum et al. (1996) relataram que a partir da década de 1970 houve maior interesse dos pesquisadores sobre a leptospirose o que levou a publicação de vários trabalhos, com ênfase em resultados com predominância dos sorotipos Pomona, Wolffi e Serjoe. É importante destacar que nessa época não era empregada a bateria de antígenos do sorotipo Hardjo.

Os inquéritos sorológicos realizados em bovinos, até o ano de 1980, acusavam percentuais de animais reatores positivos para a *Leptospira* spp da ordem de 15 a 18%, com predomínio de reações para a variante sorológica *L. wolffi*. Estudos seguintes apontavam elevação nos percentuais de animais soro reagentes para a faixa de 50 a 90%, com predomínio da variante *L. hardjo* (MOREIRA et al., 1979; BROD et al., 1994; ELLIS, 1994; VASCONCELLOS et al., 1997; NEGRÃO et al., 2000).

Investigações efetuadas em diferentes regiões comprovaram prevalências em rebanhos bovinos que variam de 74% a 100% e, em animais, de 45,56% a 62,3% (LANGONI et al., 2000; FAVERO et al., 2001; HOMEM et al., 2001;

THOMPSON et al., 2006; LAGE et al., 2007). Diferentes pesquisas constataram as sorovariedades Hardjo, Wolffi, Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Canicola entre as mais evidentes, sendo a sorovariedade Hardjo a mais prevalente em rebanhos bovinos (FAVERO et al., 2001; LILENBAUM; SOUZA, 2003; ARAÚJO et al., 2005; THOMPSON et al., 2006; LAGE et al., 2007).

Em rebanhos leiteiros, inquéritos epidemiológicos sobre leptospirose confirmam ampla distribuição de animais soro positivos em todas as Regiões do Brasil, com as seguintes prevalências médias estimadas: na Região Sul a prevalência encontrada foi de 51,69% (RECUERO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2007; CHIDEROLI et al., 2010; MESQUITA et al., 2010; TONIN et al., 2010; HASHIMOTO, 2012; HERRMANN et al., 2012; MENEGAS et al., 2013); na Região Sudeste, os estudos comprovaram 42,60% (LANGONI et al., 2000; FAVA et al., 2003; JUNQUEIRA et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2007; MAGAJEVSKI et al., 2007; SILVA, 2007; CASTRO et al., 2008; FARIA et al., 2008; VIANA et al., 2010; FERREIRA et al., 2012; SARMENTO et al., 2012). Na Região Centro-Oeste a prevalência média obtida foi de 71,70% (MADRUGA et al., 1980; JULIANO et al., 2000; MARQUES, 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; TOMICH et al., 2009; ARAÚJO, 2010); na Região Norte foi de 71,76% (HOMEM, 2001; AGUIAR et al., 2006; CHIEBAO, 2010) e na Região Nordeste foi demonstrada prevalência de 54,56% (SANTOS, 1988; ARAÚJO, 2000; ALVES et al., 2002; BARRETO JR et al., 2005; TENÓRIO et al., 2005; MINEIRO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; COELHO, 2011; SILVA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA, 2013).

3.3.3 Situação da leptospirose no Maranhão

A prevalência da doença também tem sido estudada no Maranhão, onde Santos (1988), na Ilha de São Luís, coletou 100 amostras sanguíneas em rebanho bovino leiteiro e comprovou que (94%) destas reagiram com título igual ou superior 1:100 por meio da técnica de Microaglutinação Rápida (MAR). Neste estudo os sorovares mais frequentes foram *L. ballum* (8,3%), *L. hardjo* (19,1%), seguida de *L. wolffi* com (16,7%).

Sousa (1994), em São Luís, examinou 330 (33%) amostras de trabalhadores da Companhia de Lixo e Serviços Urbanos (COLISEU) e verificou frequência de (5,45%), com destaque para o sorovar Fortbragg. Já Araújo (2000), no

mesmo município, ao pesquisar aglutininas anti-*Leptospira* em soros sanguíneos de asininos registrou frequência de (40%) para o sorovar Icterohaemorrhagiae, (9,31%) para Sentot e (7,59%) para o sorovar Butembo.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de *Leptospira* spp na capital ludovicense, Silva (2008) analisou amostras de soro humano e de cães, obtendo 103/163 (63,19%), sendo mais frequentes os sorovares Icterohaemorrhagiae 32 (11,03%) e Sentot 27 (9,31%) e, 29/38 (76,32%) com maior percentual para os sorovares Icterohaemorrhagiae 13 (10,24%) e Pomona 12 (9,45%), respectivamente.

Bezerra et al. (2010) avaliaram a frequência de *Leptospira interrogans* pela prova de Soroaglutinação Microscópica em 60 soros de asininos e 60 soros humanos detectando 51 (85%) de soro positividade para os asininos e 23 (38,34%) para os humanos.

Coelho (2011), ao analisar 100 amostras de soro sanguíneo e tecido placentário de fêmeas bovinas provenientes de matadouros de São Luís, por meio das técnicas de Soroaglutinação Microscópica e Imunohistoquímica, encontrou frequência de (64%) dos soros testados, com predominância para as variantes sorológicas Hardjo, Grippotyphosa e Wolffi, e (40%) de positividade para os tecidos avaliados.

Silva et al. (2012) investigando a prevalência e os fatores de risco da leptospirose bovina no Estado do Maranhão, identificaram 380/573 (64,81%) e 1.904/4.832 (35,94%) para rebanhos e animais reagentes, respectivamente. As soroviedades Hardjo e Wolffi foram as mais frequentes em todo o estado. Em 2013, Oliveira pesquisou no município de Bacabal 150 amostras de soro sanguíneo de fêmeas bovinas, onde (100%) foram positivas para *Leptospira* spp. A frequência observada para os sorovares Hardjo e Pomona foi de (72%) e para Wolffi foi (71,3%).

No município de São Mateus, Almeida et al. (2014) coletaram 102 soros de búfalas, sendo que (70,58%) foram positivas para um ou mais sorovares. As variedades mais frequentes foram Pomona (29,41%), Butembo (25,49%), Icterohaemorrhagiae (24,50%) e Wolffi (18,62%). Carvalho et al. (2014), em Presidente Dutra, obtiveram prevalências em ovinos de 30/37 (81%) para rebanhos e 121/379 (32%) para animais, respectivamente. Os sorogrupos mais prevalentes foram Grippotyphosa 81(67%), Wolffi e Hardjo 11(9%).

3.4 Cadeia de transmissão

As fontes de infecção da *Leptospira* spp são os reservatórios e portadores (sadios e doentes), como os animais domésticos, silvestres e roedores sinantrópicos. Nos ecossistemas rurais e urbanos, os roedores são considerados portadores universais, pois, se deslocam com facilidade e são assintomáticos (BRASIL, 1995; SEHGAL, 2006). Embora no meio rural, o rato tenha sua importância como fonte de infecção para o rebanho e o homem, os principais reservatórios da doença no interior de uma propriedade bovina são os próprios animais infectados que contaminam o pasto com os fetos abortados, corrimentos uterinos e urina contaminada (VASCONCELLOS et al., 1997; CASTRO, 2012).

A principal via de eliminação da bactéria é através da urina, podendo ser expelida até por 280 dias após a recuperação do animal (PIRES, 2010). Os roedores apresentam leptospirose prolongada e albergam *Leptospira* spp nos rins, sendo estas, excretadas no ambiente, contaminando o solo, a água e alimentos. Nos bovinos foram evidenciadas no sêmen de touros natural ou experimentalmente infectados, tornando admissível a transmissão da leptospirose pela monta natural ou inseminação artificial (SLEIGHT, 1965) e em corrimentos vaginais, o que ratifica a colonização dos órgãos da reprodução e seus anexos. Durante a fase sistêmica aguda da doença, os animais em lactação podem eliminar o agente pelo leite (RIET-CORREA; LEMOS, 2001). Essas vias de eliminação são tão importantes em bovinos quanto à urinária (ELLIS, 1994).

O ciclo de transmissão da leptospirose compreende a interação entre reservatórios animais, ambiente favorável e grupos humanos suscetíveis (HOMEM et al., 2001; BARCELLOS et al., 2003; SOUZA JUNIOR et al., 2006). A transmissão pode ocorrer de forma direta pelo contato com a urina, pele íntegra e/ou lesada, mucosas, órgãos, tecidos, sêmen, envoltórios e líquidos fetais de animais portadores e de forma indireta, que abrange o ambiente, como o pasto, água estagnada, lama, lixo e alimentos contaminados (GÓMEZ, 2008; CURSI, 2010).

A via transplacentária e mamária pode estar envolvida na transmissão da leptospirose (SPEELMAN; HARTSKEERL, 2008; PHILIP, 2011). Também há probabilidade de transmissão do micro-organismo por meio do sêmen industrializado proveniente de touro infectado, embora o sêmen contenha antibiótico, o glicerol e

armazenamento em nitrogênio líquido contribuem para a conservação da bactéria (COSTA et al., 1998; RADOSTITS et al., 2002).

A doença acomete praticamente todos os animais domésticos, selvagens, como os primatas, carnívoros, roedores, marsupiais e o homem (ACHA; SZYFRES, 2003). A susceptibilidade do rebanho bovino varia de acordo com fatores como idade, estado fisiológico e aptidão. Fêmeas de rebanhos leiteiros são mais vulneráveis à infecção em decorrência da aglomeração desses animais. A infecção ocorre de forma severa em jovens, pois, são mais susceptíveis à doença (RADOSTITS et al., 2002).

Determinados fatores contribuem como fonte permanente de infecção, como aquisição e trânsito de animais, utilização de pasto e acesso a fontes de água, onde podem estar presentes rebanhos e outras espécies, além de aglomerações de animais em exposições e leilões (WHO, 2003).

As *Leptospiras* são resistentes a 30 minutos em solo seco e 15 minutos em água corrente. São sensíveis ao pH ácido, à luz solar direta, à dessecação, ao álcool a 70%, glutaraldeído, formaldeído, aos ácidos, anti-sépticos e à pasteurização; são destruídas pelo suco gástrico em 30 minutos e crescem em pH levemente alcalino (7,2-7,6), sob uma temperatura de 28°C a 30° C. As espécies patogênicas possuem um período de sobrevivência na água e em solo úmido até por 180 dias; ao frio e ao congelamento por 100 dias a -20°C (BRASIL, 1995; FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001; JOUGLARD, 2005; HAMOND, 2010). Os herbívoros são espécies que excretam urina com pH neutro ou ligeiramente alcalino o que contribui para manter o agente vivo, em condições de multiplicação e de contaminação (VASCONCELLOS et al., 1997; RIET-CORREA; LEMOS, 2001).

3.5 Patogenia

A grande capacidade das *Leptospiras* de penetrarem no organismo do hospedeiro através da pele lesada ou íntegra e/ou mucosas oral, nasofaríngea, conjuntival, esofágica e vaginal, e sua habilidade de sobrevivência nos tecidos, constituem os maiores componentes de virulência desses bioagentes (REZENDE et al., 1997; FAINE et al., 1999; SOTO et al., 2007). Após a penetração, atingem a corrente circulatória, pulmão, fígado, baço, órgãos reprodutores e líquido céfalo-raquidiano. O período de incubação varia em torno de 7 a 14 dias. Conforme

a dose e variante infectante inicia-se a fase de multiplicação sistêmica dos micro-organismos, denominada de leptospiremia, com duração de quatro a cinco dias (FAINE et al., 1999; CINCO, 2010).

Com a evolução da infecção, ocorre a reação imunitária do hospedeiro, que antagoniza o agente e faz com que o mesmo persista em áreas do organismo onde não há imunidade humoral, ou encontra-se em níveis baixos. Em seguida as bactérias passam a persistir em locais como a câmara anterior do globo ocular, a luz dos túbulos renais, o sistema nervoso central e o trato genital (REZENDE et al., 1997; FAINE et al., 1999).

A multiplicação destes micro-organismos nos túbulos renais formam microcolônias devido à falta de fagócitos na urina, tendo o início da fase de leptospirúria, que ocorre entre o sétimo e décimo dia da evolução da doença, e sua permanência depende da resistência do hospedeiro. Microscopicamente o acometimento é multifocal e a persistência de leptospiros nos rins pode gerar lesões severas, sendo caracterizada por nefrite intersticial, necrose celular, atrofia tubular e hemorragia renal; macroroscopicamente são evidenciadas manchas brancas subcapsulares (VASCONCELLOS, 1987; FAINE, 1999; LEVETT, 2001; ACHA; SZYFRES, 2003). Os rins possuem importância epidemiológica significativa, pois, a urina passa a ser a principal via de eliminação, que pode ocorrer durante meses ou anos, tornando os animais fontes permanentes de infecção junto ao rebanho e o ambiente. Este é o fato mais importante na transmissão da leptospirose (ELLIS, 1994; RIET-CORREA; LEMOS 2001, GÓMEZ, 2008).

3.6 Imunidade

Na leptospirose, a imunidade a uma infecção inicial depende dos mecanismos humorais envolvendo a opsonização de leptospiros e fagocitose por macrófagos e neutrófilos (FAINE et al., 1999). Os macrófagos conseguem fagocitar amostras de leptospiros apatogênicas com a presença de anticorpos específicos, no entanto, as amostras patogênicas necessitam estar opsonizadas para que haja a fagocitose por estas células (MARINHO et al., 2003). A interação destas células, de complementos e anticorpos específicos, seria responsável pelo efeito bactericida sobre leptospiros patogênicos (WANG et al., 1984).

A primeira resposta sorológica relacionada à infecção é a produção de imunoglobulinas da classe M (IgM). Essas são desenvolvidas no período entre 2 a 10 dias da infecção, de acordo com a espécie acometida, resposta imunológica do animal e do tamanho da partícula antigênica (ADLER; FAINE, 1976; ADLER; FAINE, 1977). A produção de anticorpos IgG surge com 1 a 2 semanas da infecção. Os níveis de anticorpos produzidos podem perdurar por semanas a meses, assim como, por períodos de 2 a 20 anos na espécie humana e por momentos comparáveis em animais, onde podem persistir por toda sua existência (FAINE et al., 1999).

A imunidade pode ser conferida passivamente por antisoro ou por anticorpos monoclonais. Em mamíferos os anticorpos maternos são transferidos para o feto e neonatos através da via transplacentária (IgG) e colostro (IgA) (FAINE, 1982). As quantidades de anticorpos dependerão do tipo de placenta e do nível de imunoglobulinas maternas. Nos bezerros, os anticorpos maternos podem manter-se durante 2 a 6 meses.

3.7 Sinais clínicos

As espécies acometidas podem ou não apresentar sintomas, tornando-se portadores inaparentes, o que contribui para a disseminação da bactéria no ambiente (ACHA; SZYFRES, 2003; COELHO, 2011). Os sinais são variados e dependem do sorovar infectante e da susceptibilidade do animal. Em bovinos é descrita as formas aguda, subaguda e crônica (FAINE et al., 2000).

As formas agudas e subagudas são comumente observadas em bezerros, que apresentam hipertermia de 4 a 5 dias, hemorragias sob a forma de petéquias nas mucosas, hemoglobinúria e icterícia. Os animais acometidos de forma septicêmica apresentam depressão e ataxia; o sangue possui aparência achocolatado, aquoso e sem coagulação. Animais jovens, mesmo com tratamento na fase inicial da doença, raramente resistem e chegam a óbito em poucas horas (BROD; FEHLBRG, 1992; ADORNO, 2006; GARCIA, 2012).

Sullivan (1974) e Hanson (1977), ao pesquisarem fêmeas bovinas em produção, identificaram que as *Leptospira* spp presentes no leite secretado podem contribuir com o acréscimo no número de leucócitos, que resultará em reação positiva no Califórnia Mastites Test (CMT). Os animais infectados apresentam Síndrome da Queda do Leite ou Milk Drop Syndrome, caracterizada por flacidez de

úbere, agalactia ou leite com aspecto de colostro, pequenos coágulos e raios de sangue (FAINE et al., 1999). Esta Síndrome está especialmente ligada ao sorovar Hardjo (ELLIS, 1994). As mastites por *L. interrogans* sorovar Hardjo podem afetar até 50% do rebanho (BOLIN; ALT, 1999; RIET-CORREA; LEMOS 2001).

Durante a fase aguda anticorpos são produzidos ocorrendo a regressão da septicemia que desaparece após uma semana. As bactérias sobreviventes se alojam nos rins e trato genital e a infecção evolui para a fase crônica (VASCONCELLOS, 1997).

A forma crônica da doença é representada por distúrbios reprodutivos. Os sorovares Hardjo e Pomona têm sido associados à problemas de infertilidade e subfertilidade, com interferência na função do corpo lúteo, através da diminuição dos níveis de progesterona. Ocorre abortamento entre o 5º e 6º mês de gestação e retenção de envoltórios em 20% dos animais que abortam; baixa eficiência reprodutiva, repetições de cio, mumificação fetal, nascimento de bezerros fracos, prematuros e natimortalidade. Existem relatos que os sorovares Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae também estão relacionados a surtos de abortamentos (DHALIWAL et al., 1996; VASCONCELLOS et al., 1997; FAINE et al., 1999; ANZAI et al., 2002; FAVERO et al., 2002; GARCIA, 2012).

A forma subaguda se assemelha à forma septicêmica aguda, todavia ocorre de forma mais branda. São frequentes as formas ocultas, sem características aparentes, mas com títulos progressivos de anticorpos (RADOSTITS et al., 2002).

3.8 Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose é considerado difícil pela relação complexa entre agente-hospedeiro, alterações no padrão de infecção e devido aos animais domésticos não apresentarem sinais patognomônicos (FAINE et al., 1999; GOMES, 2013). Está relacionado aos aspectos clínicos, informações epidemiológicas e aos fatores de risco. Diversos métodos laboratoriais são utilizados na confirmação da doença. Existem os métodos diretos, que incidem na detecção do micro-organismo ou do seu DNA e, os métodos indiretos, relacionados à presença de anticorpos frente à atuação do agente etiológico (BOLIN; ALT, 1999; BOLIN, 2003; SARMENTO, 2012).

3.8.1 Métodos diretos

A técnica de Microscopia em Campo Escuro é instantânea na identificação de *Leptospira* spp presentes em soro sanguíneo, líquido cérebro espinhal, fluido peritoneal, tecidos ou conteúdo gástrico de fetos abortados. É utilizada principalmente em amostras de urina na fase de leptospirúria; quando realizada de forma imediata após colheita, aumenta a probabilidade da obtenção de resultado positivo, pois, o diagnóstico é fundamentado na motilidade e morfologia das Leptospiras. É um método simples, utilizado como teste populacional, no entanto, apresenta a desvantagem de baixa especificidade e sensibilidade, devido a presença de elementos nos fluidos corporais que pode dificultar a visualização do agente (SANTA ROSA, 1970; FAINE, 1982; BOLIN, 1996; LEVETT, 2001).

O isolamento bacteriano é um teste de alta especificidade, pois, identifica o sorovar infectante e permite um diagnóstico definitivo (VASCONCELLOS, 1987; VASCONCELLOS, 1997; FAINE et al., 1999). Os espécimes clínicos de eleição são urina, útero, rim e produtos oriundos de abortamento (ELIIS, 1994). Contudo, o método possui limitação, pois, trata-se de uma técnica difícil, onerosa e desenvolvida unicamente em laboratórios de referência (BOLIN; ALT, 1999; BOLIN, 2003).

O bio ensaio em animais de laboratório mediante a inoculação de *Leptospira* spp, sobretudo de estirpes que não se adequam aos meios de cultura, é uma técnica muito utilizada para a demonstração do quadro clínico e isolamento da bactéria. São empregados hamsters (*Mesocricetus auratus*), por ser a espécie mais sensível à ação das Leptospiras, vindo a óbito em aproximadamente 4 dias. As cobaias também são utilizadas e são inoculadas pela via intraperitoneal, com sangue, macerados de órgãos ou urina de animais infectados (CACCHIONE, 1962; SANTA ROSA, 1970; ENRIETTI, 2001).

A técnica de Imunohistoquímica pode ser realizada para diagnóstico de *Leptospira* spp em órgãos, visando correlacionar as lesões com a presença da bactéria nos tecidos (BOLIN, 2003). A prova de Imunofluorescência direta é utilizada para identificar o agente no sangue, tecidos, urina e sedimentos. É uma técnica restrita para de estudos experimentais, com pouco uso no diagnóstico de casos clínicos (LEVETT, 2001).

O teste de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é utilizado para a investigação em quantidades mínimas do DNA do micro-organismo, utilizando amostras biológicas, como soro, líquido cérebro-espinhal, urina, fezes, tecidos, leite, sêmen e embrião (BAL et al., 1994; PINHEIRO et al., 2001; FRAGA, 2009). Entretanto, possui desvantagens por apresentar dificuldade no isolamento, ser laborioso, utilizado de forma restrita por alguns laboratórios e ser oneroso. É um importante instrumento para o diagnóstico da leptospirose, por diferenciar *Leptospiras* saprófitas das patogênicas além, de ter alta especificidade e sensibilidade (KOSITANONT et al., 2007; LILENBAUM, 2009).

3.8.2 Métodos indiretos

A Soroaglutinação Microscópica (SAM) é considerada a técnica sorológica para o diagnóstico da leptospirose, preconizada pela OIE (padrão ouro) e de referência internacional, na qual é empregado suspensões de sorovares de *Leptospira* spp. É a prova mais utilizada em inquéritos epidemiológicos por detectar sorogrupos presentes em uma população (LEVETT, 2001; BRASIL, 2005; OIE, 2014). Possui sensibilidade e especificidade elevadas, porém, há desvantagem de não diferenciar anticorpos IgM e IgG (anticorpos resultantes de infecção ou vacinais). A SAM detecta anticorpos séricos específicos, contra uma coleção de antígenos vivos dos diferentes sorogrupos de *Leptospira*. O ponto de corte (*cut-off*) do teste é a diluição dos soros igual ou superior a 1:100 (BRASIL, 1997; LEVETT, 2001; OIE, 2014).

A prova de Macro Aglutinação e de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com antígenos inativados pelo formol, são provas que diagnosticam a leptospirose na fase aguda da doença do susceptível (LEVETT, 2001). A técnica de RIFI pode ser utilizada para identificar *Leptospira* spp em tecidos, sangue, urina ou sedimentos, mas o conjugado de anticorpos fluorescentes atualmente em uso não é sorovar-específico, o que tende a negatividade da prova partir da convalescença do animal (BRASIL, 1995; BOLIN, 2003).

A prova de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foi descrita por Engval e Perlmann (1971), tem como vantagens a existência de kits comerciais, ser de fácil execução, os reagentes podem ser armazenados por maior período de

tempo sem perderem a reatividade e a capacidade de diferenciar a infecção ocorrida no passado com a presente, pois, há detecção de imunoglobulinas específicas da classe IgM e IgG, contudo, é contra indicada para a identificação dos sorogrupos e das sorovariedades (WHO, 2003; SOUSA, 2012).

3.9 Controle

As ações de controle da leptospirose devem conter estratégias que envolvam os fatores ambientais, os reservatórios e o homem, desta forma, deve estar relacionada à cadeia de transmissão do agente, englobando as fontes de infecção com realização de diagnóstico, prevenção da entrada de animais portadores, detecção e eliminação dos mesmos das propriedades, realização de exames sorológicos, tratamento e imunoprofilaxia dos susceptíveis (HASHIMOTO, 2012).

Está condicionado ainda à eliminação do excesso de água livre, armazenamento dos alimentos para o uso humano e animal em instalações que impeçam a entrada e permanência de roedores e de outras espécies domésticas, destino correto do lixo, descarte de materiais em desuso, desratização, realização de inseminação artificial através de centrais idôneas, além de tomadas de medidas de biossegurança (COELHO, 2011; SILVA et al., 2012).

Conforme Leite (2000), a vacinação deve ser aplicada aos animais susceptíveis, na primo-vacinação dos animais de produção, entre três a quatro meses de idade, com dose de reforço após trinta dias e com vacinações semestrais ou anuais, de acordo com as condições ambientais, levando em consideração que quanto maior o risco de exposição, menor deve ser o intervalo entre as revacinações.

É importante que o programa de vacinação deva ser adaptado à população alvo e que o rebanho seja vacinado antes de sua exposição a áreas contaminadas. Os bovinos destinados à reprodução que necessitam ser transportados deverão conter certificação quanto à ausência de sinais clínicos para leptospirose, conforme preconizado pelo Código Sanitário para os Animais Terrestres (OIE, 2014).

A vacinação representa em uma propriedade importante medida sanitária de controle, induzindo a diminuição das prevalências de animais soro reagentes no rebanho. É importante considerar que as vacinas comercializadas no Brasil não abrangem todas as variantes sorológicas. As bacterinas encontradas no mercado contêm as variantes sorológicas Hardjo, Icterohaemorrhagie, Pomona, Brastilava, Wolffii e Tarassovi (MOREIRA et al., 2010). Higino et al. (2014) abordam que as bacterinas antileptospirose disponíveis podem proteger os animais contra a doença, mas não contra a infecção. A alternativa mais eficaz é a elaboração de vacinas com sorovariedades específicas que infectam o rebanho prevalente em cada propriedade ou região (FAINE et al., 1999; MOREIRA et al., 2010).

O uso conjugado da SAM como técnica de triagem e posterior exame da urina por PCR pode ser utilizada como estratégia de controle para a identificação de animais portadores (CARDOSO et al., 2008).

3.10 Tratamento

O tratamento das fontes de infecção possui a finalidade de minimizar o potencial de transmissibilidade, tendo em vista, o bloqueio da eliminação através da urina, sêmen e secreção vaginal. Diante de diversos produtos testados, a estreptomicina e seus análogos (diidro), é o medicamento mais indicado. A dose recomendada usualmente é única, na concentração de 25mg/Kg de peso vivo, aplicada por via intramuscular (MOREIRA et al., 2010), porém, a terapia com diidroestreptomicina é limitada, por ser dispendiosa. Para obtenção de boa eficácia há necessidade de 50 mg/Kg por peso vivo, sendo justificado o seu uso somente em animais de reprodução com grande valor zootécnico (FAINE et al., 1999; LEITE, 2000).

3.11 Importância econômica

As perdas econômicas causadas pela leptospirose estão associadas aos custos diretos, como falhas no desempenho reprodutivo, que implica em infertilidade, aumento da frequência de abortamentos, podendo atingir até 30%, nascimento de natimortos, atraso no retorno à atividade ovariana pós-parto, aumento no período de intervalo entre partos, diminuição da produção de bezerros,

nascimento de crias fracas, bem como, à queda da produção leiteira (FAINE et al., 1999; AZEVEDO, 2001; RADOSTITS et al., 2002).

Os custos indiretos estão relacionados às despesas com assistência veterinária, tanto com animais de produção, quanto animais domésticos, vacinas, exames laboratoriais, implementação de programas sanitários, controle de roedores em pastos e na obtenção de equipamentos de proteção individual (EPI's) para as pessoas que se encontram sujeitas aos riscos (FAINE et al., 1999; AZEVEDO, 2001).

A doença acarreta grandes prejuízos, principalmente em criações de subsistência, onde os criadores são dependentes da produção animal para o sustento de seus familiares (FAINE et al., 1999). No Brasil, até o momento, não foram estimados valores financeiros voltados a perdas econômicas relacionadas à leptospirose bovina, no entanto, com as perdas diretas e indiretas que a enfermidade ocasiona, consequentemente, os custos são elevados pela manutenção de animais de baixa produção no rebanho (AZEVEDO, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O Estado do Maranhão está localizado a 05° 05' 12" latitude Sul e 42° 48' 42" a oeste do Meridiano de Greenwich, com temperatura em torno de 26°C e precipitação pluviométrica de 197 mm (LABMET, 2014). Possui área territorial de 331.937,450 km². Está localizado a Noroeste da Região Nordeste e limita-se ao Norte com o Oceano Atlântico, Sul e Sudoeste com o Estado do Tocantins, Leste, Nordeste e Sudeste com o Estado do Piauí e ao Oeste e Noroeste com o Estado do Pará. O Estado contém 217 municípios e uma população estimada em 6.794.301 habitantes (IBGE, 2013).

De acordo com a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED-MA), o Estado encontra-se dividido em 18 Unidades Regionais/UR's: Açailândia, Bacabal, Balsas, Barra do Corda, Caxias, Chapadinha, Codó, Imperatriz, Itapecuru-Mirim, Pedreiras, Pinheiro, Presidente Dutra, Rosário, Santa Inês, São João dos Patos, São Luís, Viana e Zé Doca (ANEXO A).

O delineamento da pesquisa abrangeu os principais municípios das bacias leiteiras pertencentes às Regionais de: **Bacabal** (Bacabal, Bom Lugar, Lago Verde, Olho d'Água das Cunhãs, São Luís Gonzaga e Vitorino Freire), **Pedreiras** (Bernardo do Mearim, Igarapé Grande, Pedreiras, Trizidela do Vale, Lima Campos, Poção de Pedra e Lago da Pedra) e **São Luís** (São Luís).

As bacias leiteiras das Regionais de Bacabal e Pedreiras estão localizadas na Região Central do Estado do Maranhão, enquanto que, as bacias da Regional de São Luís estão localizadas ao Nordeste do Estado. Foi considerada bacia leiteira as principais aglomerações onde a pecuária é predominantemente destinada à produção de leite. Os municípios de Bacabal e Vitorino Freire; Bernardo do Mearim e Igarapé Grande, juntamente com o município de São Luís, são considerados como os principais produtores de leite das Regionais supra citadas.

O critério de seleção baseou-se nos municípios com a produção de leite $\geq$ 1.000 litros/dia, considerada expressiva. Estes municípios, conjuntamente produzem em média 47.261 litros de leite/dia. Com relação aos municípios não amostrados pertencentes às Regionais, deve-se ao fato de que no momento não continham produção leiteira compatível com o objetivo deste estudo. Esta pesquisa revestiu-se

de um estudo transversal observacional, realizada no período de abril a outubro de 2013. No mapa a seguir, encontram-se as Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Ma (Figura 1).

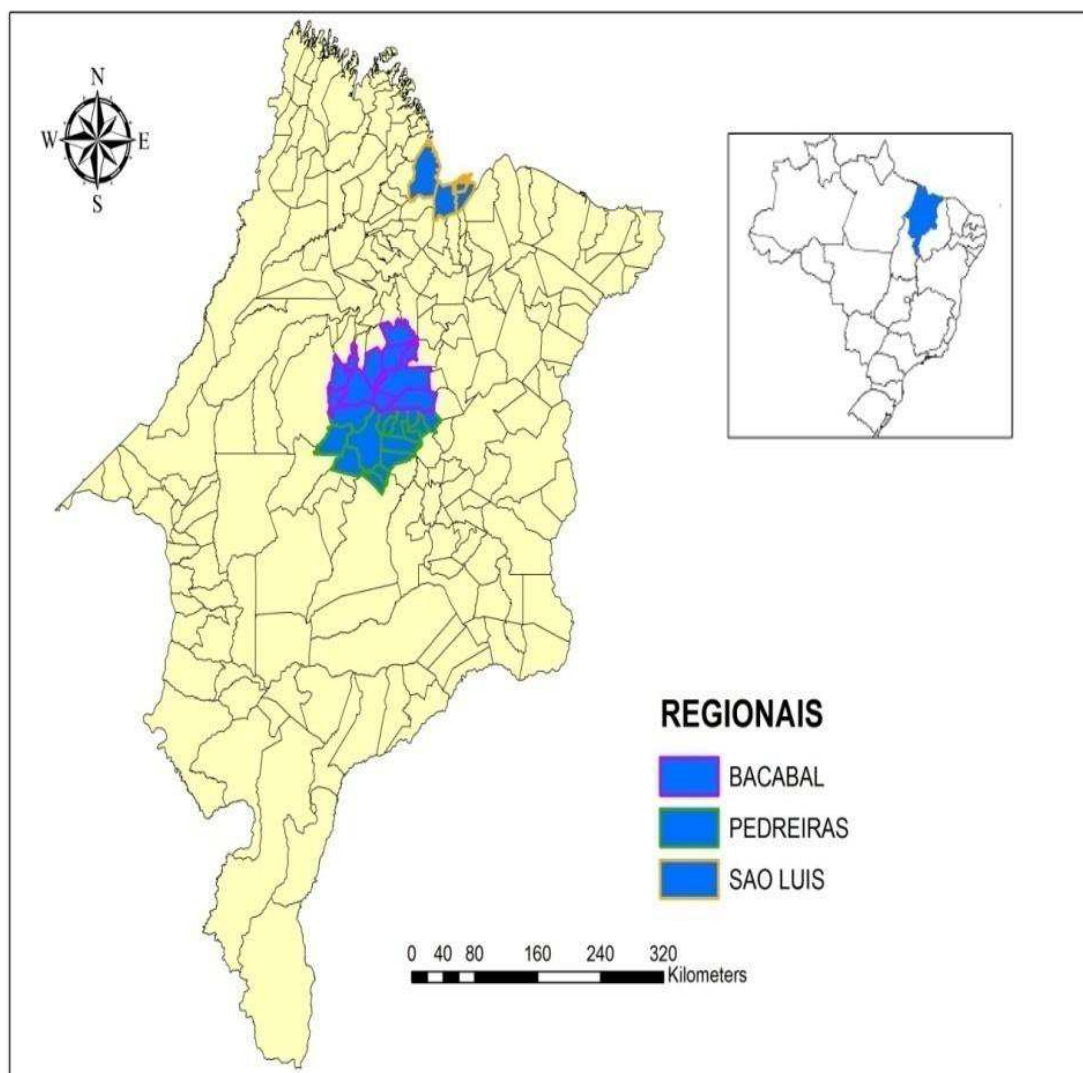


Figura 1 - Mapa das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, MA, Brasil, 2014

4.2 Amostragem

A amostragem foi estabelecida conforme preconizado pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES (1979), para estudo de estimativa de prevalência. Para determinar o tamanho da amostra foi adotado como valor de

referência a prevalência encontrada por Langoni et al. (2000), no Estado de São Paulo, de 38,48%, considerando um erro (d) não superior a 12% e um nível de confiança de 95% (z). Para definir o número de amostras testadas foi utilizada a seguinte expressão:

n = número de amostras
p = prevalência esperada
z = grau de confiança
d = margem de erro

p = 38,48%
z = 1,96 (95%)
d = 12 % de erro, onde:

$$n = \frac{p(100 - p)z^2}{\left[\frac{p \cdot d}{100}\right]^2} \Rightarrow n = \frac{38,48(100 - 38,48)1,96^2}{\left[\frac{38,48 \times 12}{100}\right]^2} = 426^*$$

*Foi realizado ajuste estatístico para 420 amostras sanguíneas

4.3 Seleção dos rebanhos e animais

Foram utilizados os cadastros de propriedades e o número de rebanho leiteiro em consonância com a AGED (2012). Foi considerado um efetivo de 420 fêmeas bovinas com idade ≥ 24 meses, distribuídas em 5 rebanhos, com 6 animais cada, por município; o que resultou em 30 animais por município e 70 rebanhos distribuídos nas três Regionais. O sorteio realizado foi de forma aleatória simples e as amostras selecionadas foram iguais para todos os rebanhos. A distribuição dos rebanhos e o número total de amostras, conforme as UR's e municípios encontram-se distribuídos na (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das Unidades Regionais com seus respectivos municípios, número de rebanhos e amostras, Maranhão, Brasil, 2014

Unidades Regionais	Municípios	Nº de Rebanhos	Nº de Amostras
BACABAL	Bacabal	5	30
	Bom Lugar	5	30
	Lago Verde	5	30
	Olho d' Água das Cunhãs	5	30
	São Luís Gonzaga	5	30
	Vitorino Freire	5	30
PEDREIRAS	Bernardo do Mearim	5	30
	Igarapé Grande	5	30
	Lago da Pedra	5	30
	Lima Campos	5	30
	Pedreiras	5	30
	Poço de Pedras	5	30
	Trizidela do Vale	5	30
SÃO LUÍS	São Luís	5	30
TOTAL		70	420

Fonte: Elaborada pela autora

4.4 Colheita das amostras

As amostras de soro foram colhidas nos meses de maio e junho de 2013. No momento da colheita o proprietário/responsável foi informado sobre a importância da enfermidade com relação aos riscos para saúde animal e humana e, quanto às perdas econômicas; o mesmo ao concordar em participar da pesquisa assinava o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). A cada colheita era utilizado um formulário, contendo informações sobre o nome, sexo, idade, raça e pelagem dos animais, além da Unidade Regional, município, proprietário, propriedade, data da coleta e sequência das amostras (APÊNDICE B). O sangue foi colhido por punção da veia jugular, após limpeza e desinfecção da área com álcool-iodado. Foram utilizadas agulhas descartáveis (25x8mm) e tubos (10 mL) com sistema de vácuo (vacutainer), esterilizados e contendo gel separador. O

material sorológico foi encaminhado em caixas isotérmicas com gelo reutilizável para o Laboratório de Doenças Infecciosas do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), onde o soro foi separado do sangue total por centrifugação a 2.500 G por cinco minutos. As alíquotas de soro obtidas foram transferidas com pipeta Pasteur para tubos tipo Eppendorf®, com capacidade de 2,0 mL, identificados com o número do animal e código da propriedade, e, mantidas à temperatura de -20°C até a realização do teste de SAM.

4.5 Aplicação do questionário epidemiológico

Em cada propriedade estudada foi aplicado questionário epidemiológico (APÊNDICE C), com o objetivo de avaliar potenciais fatores de riscos associados à leptospirose nos rebanhos estudados. Foram analisadas as seguintes variáveis: existência de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos, aves, cães e gatos; aquisição e procedência de animais; realização de quarentena; quantidade de nascimentos de bezerros ao ano e apresentação dos mesmos ao nascer; ocorrência de abortamentos nos últimos 12 meses; destino dos animais que abortaram; idade que a fêmea foi coberta pela primeira vez; utilização de inseminação artificial; utilização de piquetes maternidade; destinação dos fetos abortados e seus anexos; aquisição de animais com a finalidade para reprodução; alimentação dos animais fora da propriedade; presença de roedores ou outras espécies que circulam no ambiente de alimentação ou no armazenamento de ração; existência de áreas alagadiças; aluguel de pasto; principal fonte de água; assistência veterinária; conhecimento do criador em relação às doenças da esfera reprodutiva e realização de vacinação contra leptospirose.

4.6 Georreferenciamento dos dados e das propriedades

Para o georreferenciamento dos dados e das propriedades, utilizou-se aparelho de navegação GPS (Posicionamento Global por Satélite) da marca Garmin® com acurácia de aproximadamente dois metros, para tomada de coordenadas geográficas dos municípios e das propriedades amostradas. Cada endereço foi localizado em um ponto no espaço e identificado de acordo com as informações do banco de dados de propriedades da AGED/MA, contendo o código

da propriedade com onze dígitos (sete dígitos correspondiam ao código do município no IBGE e quatro dígitos referentes aos códigos da propriedade: nome, município, número total e sequência de numeração das amostras). Para a confecção dos mapas temáticos e mapeamento dos focos utilizou-se o *software* Arc Gis.

4.7 Técnica Sorológica

A técnica sorológica utilizada foi a de Soroaglutinação Microscópica (SAM), descrita por Galton et al. (1965) e Cole et al. (1973), recomendada pela WHO (1967) e OIE (2010). Foram utilizados antígenos vivos compostos por 24 sorovares do complexo *Leptospira* spp, provenientes do banco do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), listados na (Tabela 2).

Tabela 2 - Coleção de antígenos do complexo *Leptospira* spp de referência utilizados na prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), segundo espécie, sorogrupo e sorovar, 2014

Espécie	Sorogrupo	Sorovar
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo; Wolffi
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis; Brastilava
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Sentot
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni; Icterohaemorrhagiae
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes
<i>L. interrogans</i>	Cynopteri	Cynopteri
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Butembo; Castellonis

Tabela 2 - Coleção de antígenos do complexo *Leptospira* spp de referência utilizados na prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), segundo espécie, sorogrupo e sorovar, 2014 (continuação)

<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi
<i>L. borgpetersenii</i>	Calledoni	Whitcombi
<i>L. kirschneri</i>	Grippotypcosa	Grippotypcosa
<i>L. noguchi</i>	Panamá	Panama
<i>L. santarosai</i>	Bataviae	Bataviae
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc
<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana

Fonte: WHO, 1967; OIE, 2010

4.8 Preparo do antígeno

O antígeno foi preparado utilizando-se culturas vivas de 24 variantes sorológicas de *Leptospira interrogans* mantidas em meios semi-sólido de FLETCHER (1928) e meio líquido EMJH (DIFCO®-USA), suplementados com 10% de soro de coelho estéril, filtrado em membrana Millipore de 45 µm para retenção de resíduos que poderiam estar contidos no soro. A metodologia adotada foi modificada por Santos (2013), sendo os dois meios preparados, esterilizados e posteriormente transferidos para 24 tubos de ensaio e adicionados o meio de FLETCHER e aos outros 24 tubos foram adicionados o meio de EMJH (DIFCO®-USA). Sequencialmente os tubos foram incubados em estufa bacteriológica à temperatura de 28° a 30°C durante 7 a 14 dias. Os inóculos foram repicados semanalmente em novos tubos contento os dois meios. Como parte do protocolo laboratorial, todas as culturas eram examinadas ao microscópico de campo escuro antes de iniciar a técnica, como o propósito de averiguar o grau de pureza, motilidade, possível auto-aglutinação e contaminação.

4.9 Realização e interpretação da Técnica de SAM

Inicialmente cada amostra de soro foi diluída a 1: 50 (0,1mL de soro testado + 0,4mL de solução tamponada de Sorensen com pH 7,2). Desta diluição foi retirada, com um pipetador automático, 50µL que foram distribuídas em placas de porcelana escavada. Em seguida foi adicionado 50µL de cada antígeno correspondente, de acordo com a numeração das placas (soro testado x antígeno), obtendo-se uma diluição de 1:100. Cada amostra sorológica foi testada frente à bateria antigênica de 24 sorovares do complexo *Leptospira* spp. A seguir, as diluições de 1:100 eram transferidas das placas para lâminas de fundo fosco, para visualização das reações de aglutinação no microscópico de campo escuro, com lente objetiva de 10 x 0,20 e ocular de 10 x100. As amostras positivas ao título inicial (triagem) foram novamente testadas para definir o título de anticorpos para cada sorovar, utilizando diluições crescentes de 1:100 até a 1:800. As amostras reagentes a 1:100 (com 3 +++) foram retestadas para confirmação da titulação final de aglutininas anti-*Leptospira* spp, efetuando-se as diluições em escalas geométricas de razão de dois da solução tamponada de Sorensen acrescida de 50µL do antígeno reagente. Os títulos das reações positivas foram considerados recíprocos, quando 50% ou mais das *Leptospiras* apresentavam aglutinação por campo microscópico, na diluição de 1:100.

Para interpretação da prova de SAM foi considerado reação positiva a presença de aglutininas anti-*Leptospira* spp nas amostras com aglutinação microscópica igual ou superior a 50 em relação ao controle positivo. Após a leitura o grau de aglutinação seguia o seguinte critério: 1 + (menos de 50% de *Leptospira* aglutinada), 2 + (cerca de 51% a 74% de aglutinações) e 3 + (75 a 100% de aglutinações). Foram então consideradas positivas as amostras examinadas com título igual ou superior a 1:100, com 50% de aglutinação ou desaparecimento das células do campo, em microscopia de campo escuro.

4.10 Análise dos dados

As informações dos questionários, assim como o resultado da sorologia, foram armazenadas em um banco de dados com utilização do programa Microsoft Access®. A propriedade foi considerada positiva (foco) para a presença de

Leptospira spp quando apresentasse pelo menos um animal reagente. Para avaliar a associação entre a soro positividade e as variáveis estudadas realizou-se a análise univariada. Foi utilizado o teste Exato de Fisher ou o teste Qui-quadrado de Independência. O nível de significância utilizado foi de 5% ($P < 0,05$). Foram estimadas razões de probabilidades *Odds Ratio* (OR), com intervalos de confiabilidade de 95%. Os Programas Estatísticos utilizados foram o InStat 2.0, versão 2003 e o EpiInfo, versão 2007.

5 RESULTADOS

Do total de amostras analisadas, 70 para rebanhos e 420 para animais, provenientes das bacias leiteiras das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís todas (100%) foram reagentes para um dos 24 sorovares da coleção de antígenos anti-*Leptospira* spp (Tabela 3).

Tabela 3- Frequência de aglutininas anti-*Leptospira* spp identificadas em rebanhos e animais das bacias leiteiras das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014

Unidades Regionais	Municípios	Rebanhos reagentes		Animais reagentes	
		N	%	N	%
Bacabal	Bacabal	5	100	30	100
	Bom Lugar	5	100	30	100
	Lago Verde	5	100	30	100
	Olho d' Água das Cunhãs	5	100	30	100
	São Luís Gonzaga	5	100	30	100
	Vitorino Freire	5	100	30	100
	Bernardo do Mearim	5	100	30	100
Pedreiras	Igarapé Grande	5	100	30	100
	Lago da Pedra	5	100	30	100
	Lima Campos	5	100	30	100
	Pedreiras	5	100	30	100
	Poção de Pedras	5	100	30	100
	Trizidela do Vale	5	100	30	100
	São Luís	5	100	30	100
Total		70	100	420	100

Fonte: Elaborada pela autora

O mapeamento dos rebanhos focos da infecção por *Leptospira* spp nas três Unidades Regionais avaliadas está evidenciado nos mapas (Figuras 2, 3 e 4).

As áreas vazias nos demais municípios pertencentes às Regionais, significa a inexistência de rebanhos amostrados neste estudo.

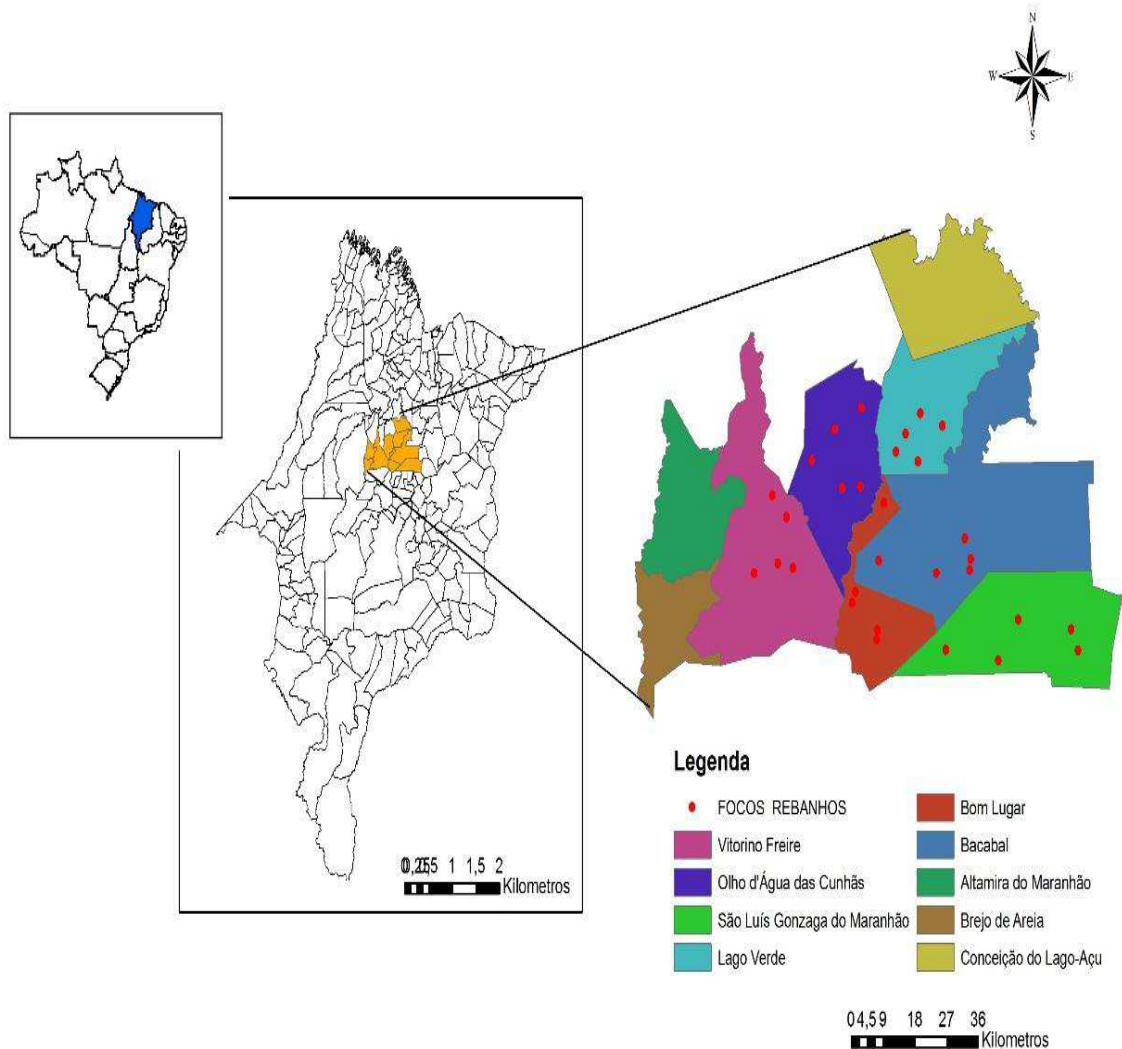


Figura 2 - Distribuição espacial de focos de leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros da Unidade Regional de Bacabal, MA, Brasil, 2014

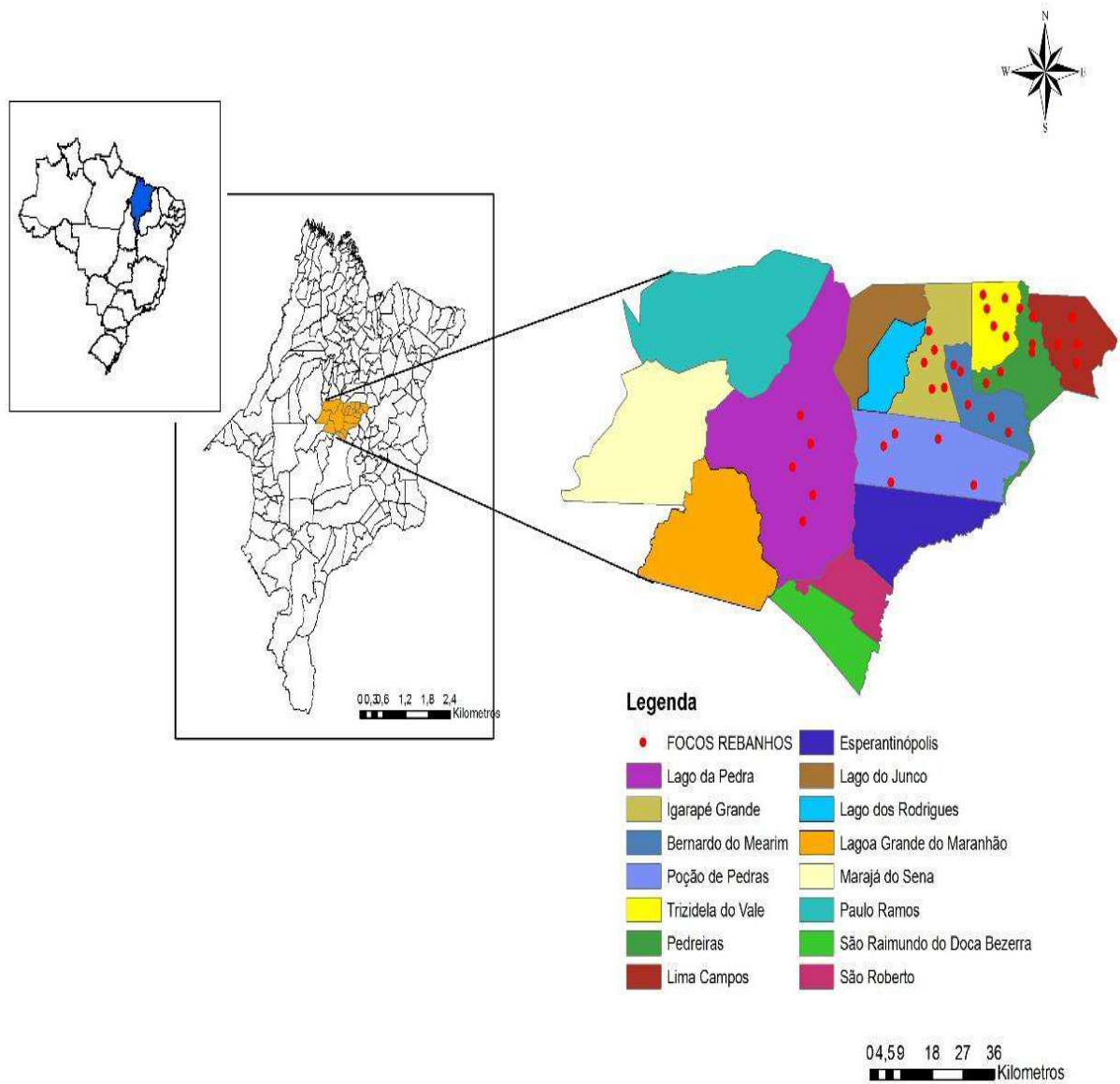


Figura 3- Distribuição espacial de focos de leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros da Unidade Regional de Pedreiras, MA, Brasil, 2014

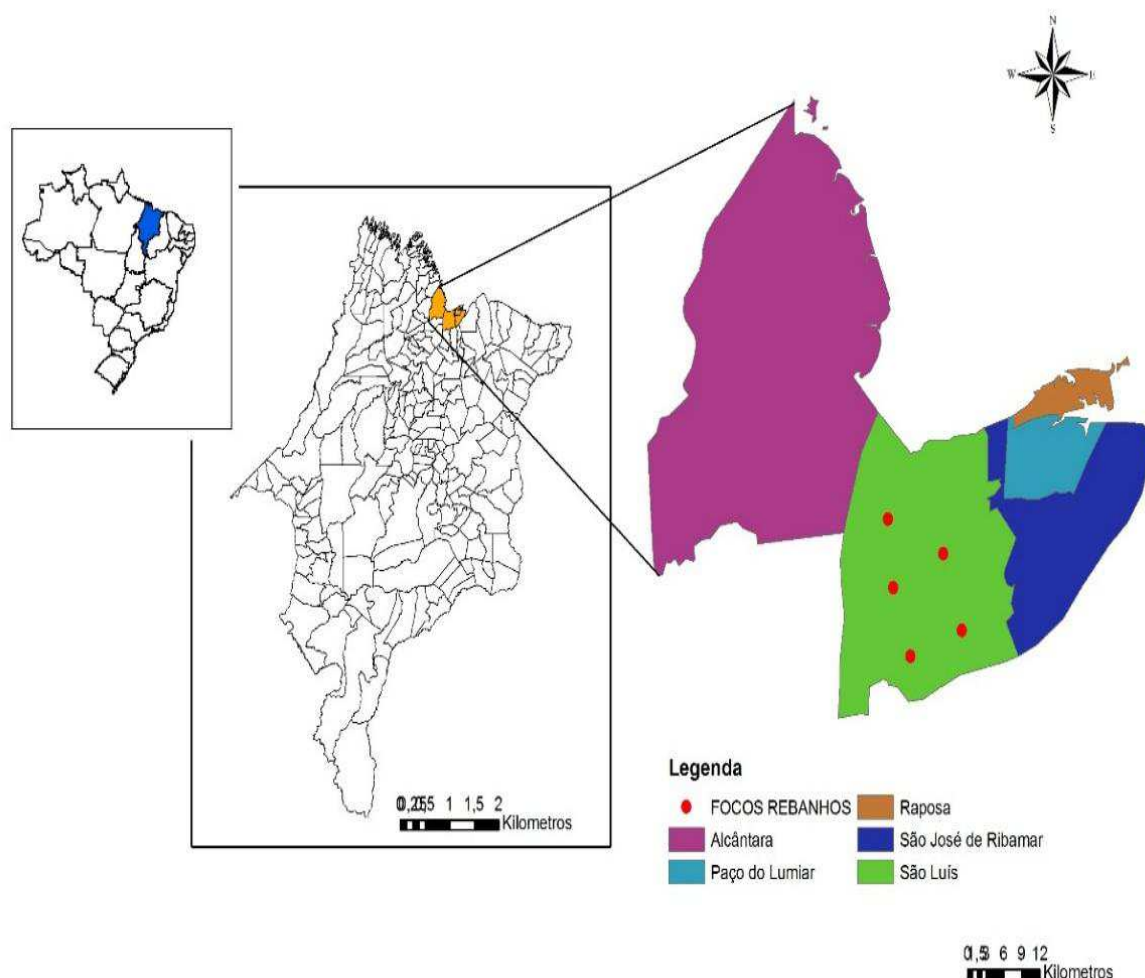


Figura 4- Distribuição espacial de focos de leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros da Unidade Regional de São Luís, MA, Brasil, 2014

Dos 24 sorovares pesquisados através da técnica SAM em fêmeas bovinas das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, os mais frequentes foram: Patoc 410/420 (97%), Castellonis 351/420 (84%), Hardjo 347/420 (83%), Hebdomadis 335/420 (80%), Wolffi 330/420 (79%), Sentot 328/420 (78%), Autumnalis 321/420 (76%), Butembo 322/420 (76%), Brastilava 298/420 (71%), Icterohemorrhagiae 300/420 (71%), Pomona 286/420 (69%) e Andamana 286/420 (68%), demonstrados na (Tabela 4).

Tabela 4- Frequência de sorovares anti-*Leptospira* spp diagnosticados em fêmeas bovinas das bacias leiteiras das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014

Sorovares	Nº de Animais	Reagentes	
		n	%
Patoc	420	410	97
Castellonis	420	351	84
Hardjo	420	347	83
Hebdomadis	420	335	80
Wolffi	420	334	80
Sentot	420	328	78
Autumnalis	420	321	76
Butembo	420	322	76
Brastilava	420	298	71
Icterohemorrhagiae	420	300	71
Pomona	420	296	70
Andamana	420	286	68
Copenhageni	420	267	64
Grippotyphosa	420	249	59
Pyrogenes	420	232	55
Shermani	420	226	54
Panama	420	202	49
Javanica	420	185	44
Canicola	420	182	43
Australlis	420	153	36
Cynopteri	420	149	35
Tarassovi	420	145	35
Whitcombi	420	125	30
Bataviae	420	118	28

Fonte: Elaborada pela autora

Foram realizadas diluições decimais sucessivas do soro até 1:800 com a finalidade de inferir a severidade da infecção (Tabela 5).

Tabela 5- Títulos aglutinantes anti-*Leptospira* observados em soro sanguíneo de fêmeas bovinas das bacias leiteiras das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014

Sorovares	Diluições					
	1:200	%	1:400	%	1:800	%
Australlis	06	4	02	1	02	1
Brastilava	09	3	06	2	05	2
Autumnalis	11	3	09	3	05	2
Butembo	15	5	12	4	12	4
Castellonis	32	9	28	8	21	6
Bataviae	02	2	00	00	00	00
Canicola	05	3	04	2	03	2
Sentot	45	14	41	12	29	9
Whitcombi	03	2	02	2	01	1
Cynopteri	03	2	01	0,7	01	0,7
Grippotyphosa	07	3	04	2	04	2
Hebdomadis	19	6	13	4	11	3
Compenhageni	08	3	05	2	03	1
Icterohemorrhagiae	17	6	11	4	06	2
Javanica	02	1	02	1	02	1
Panama	05	2	04	1	01	0,5
Pomona	12	4	10	4	08	3
Pyrogenes	12	5	08	3	04	2
Hardjo	35	10	26	7	21	6
Wolffi	31	9	21	6	17	5
Shermani	04	2	02	1	01	0,4
Taransovi	03	2	02	1	01	0,7
Adamanda	18	6	09	3	08	3
Patoc	108	26	83	20	63	15
Total	412	132	305	93,7	212	76,3

As avaliações das amostras por rebanhos nas bacias leiteiras das Regionais de Bacabal e Pedreiras demonstrou maior frequência para o sorovar Hardjo com 16/30 (53,33%) e 14/35 (40%), respectivamente. O sorovar Wolffi predominou na bacia leiteira da Regional de Pedreiras, com 18/35 (51%), seguido de Bacabal com 14/30 (47%). Com relação ao sorovar Pomona, a frequência observada na Regional de Bacabal foi de 13/30 (43%) e de 4/35 (11%) para Pedreiras. Na

Regional de São Luís não houve animal reagente aos sorovares Wolffi e Pomona (Tabela 6).

Tabela 6- Frequência dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona identificados em rebanhos leiteiros, das bacias das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014

Unidades		Hardjo		Wolffi		Pomona	
Regionais	Nº de Rebanhos	n	%	n	%	n	%
Bacabal	30	16	53 ^{aA}	14	47 ^{aA}	13	43 ^{aA}
Pedreiras	35	14	40 ^{aA}	18	51 ^{aA}	4	11 ^{aA}
São Luís	5	1	20 ^{aA}	0	0 ^{aA}	0	0 ^{aA}
Total	70	31	44	32	46	17	24

- Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente (Qui-quadrado; $P>0,05$);
- Valores seguidos de letras maiúscula iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente (Qui-quadrado; $P>0,05$).

Das amostras de soros dos animais das bacias leiteiras das Regionais estudadas, observou-se que os sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona tiveram maior frequência na Regional de Pedreiras com 185/210 (88%), 178/210 (85%) e 156/210 (74%), respectivamente. Na Regional de São Luís a frequência para o sorovar Hardjo foi de 26/30 (87%), Wolffi 22/30 (73%) e Pomona 16/30 (53%), na Regional de Bacabal o sorovar Hardjo foi encontrado com o percentual de 136/180 (76%), Wolffi 130/180 (72%) e Pomona de 114/180 (63%), conforme (Tabela 7).

Tabela 7- Frequência dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona em fêmeas bovinas, das bacias leiteiras, das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014

Unidades Regionais	Nº de Animais	Hardjo		Wolffi		Pomona	
		n	%	n	%	n	%
Bacabal	180	136	76 ^{aA}	130	72 ^{aA}	114	63 ^{aA}
Pedreiras	210	185	8 ^{aA}	178	85 ^{aA}	156	74 ^{aA}
São Luís	30	26	87 ^{aA}	22	73 ^{aA}	16	53 ^{aA}
Total	420	347	83	330	79	286	68

- Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente (Qui-quadrado; $P>0,05$);
- Valores seguidos de letras maiúscula iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente (Qui-quadrado; $P>0,05$).

Quanto à frequência encontrada nos rebanhos das bacias leiteiras, por municípios das Regionais, observou-se que os municípios de Olho d' Água das Cunhãs, Bom Lugar e Bacabal apresentaram (80%) de rebanhos positivos ao sorovar Hardjo, enquanto Lago da Pedra, Igarapé Grande e Bernardo do Mearim a frequência obtida foi (60%) e São Luís de (20%). O sorovar Wolffi foi observado nos rebanhos do município de Bom Lugar, com frequência de (80%). Esta variante sorológica foi encontrada com frequência de (60%) em Olho d' Água das Cunhãs, Bacabal, Lago da Pedra, Igarapé Grande, Bernardo do Mearim e Trizidela do Vale. Já a sorovariedade Pomona foi encontrada em (80%) dos rebanhos nos municípios de Vitorino Freire e em (40%) em Olho d' Água das Cunhãs, Lago Verde, Bom Lugar e Bacabal. Houve (20%) de rebanhos reagentes a este sorovar em São Luís Gonzaga, Lago da Pedra, Igarapé Grande, Bernardo do Mearim e Poção de Pedras. Não foi detectado o sorovar Hardjo em rebanhos bovinos das bacias leiteiras dos municípios de Vitorino Freire e Lima Campos, assim como o sorovar Wolffi não foi encontrado nos rebanhos de Vitorino Freire e São Luís e, a variante sorológica Pomona não foi diagnosticada em rebanhos leiteiros de Trizidela do Vale, Pedreiras, Lima Campos e São Luís (Tabela 8).

Tabela 8- Frequência dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona diagnosticados no exame de Leptospirose realizado em rebanhos bovinos, das bacias leiteiras, por município, das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014

Unidades Regionais	Municípios	Nº de Rebanhos	Hardjo		Wolffi		Pomona	
			n	%	n	%	n	%
Bacabal	Vitorino Freire	5	0	0	0	0	4	80
	Olho d' Água das Cunhãs	5	4	80	3	60	2	40
	Lago Verde	5	2	40	2	40	2	40
	São Luís Gonzaga	5	2	40	2	40	1	20
	Bom Lugar	5	4	80	4	80	2	40
	Bacabal	5	4	80	3	60	2	40
	Subtotal	30	16	53	14	47	13	43
Pedreiras	Lago da Pedra	5	3	60	3	60	1	20
	Igarapé Grande	5	3	60	3	60	1	20
	Bernardo do Mearim	5	3	60	3	60	1	20
	Poção de Pedras	5	2	40	2	40	1	20
	Trizidela do Vale	5	2	40	3	60	0	0
	Pedreiras	5	1	20	2	40	0	0
	Lima Campos	5	0	0	2	40	0	0
	Subtotal	35	14	40	18	51	4	11
São Luís		5	1	20	0	0	0	20
Subtotal		5	1	20	0	0	0	0
Total		70	31	44	32	46	17	24

Analisando o resultado da SAM para diagnóstico de leptospirose nas 420 fêmeas bovinas examinadas nas três Regionais estudadas, por município verificou-se que o sorovar Hardjo foi o mais frequente (83%), seguido de Wolffi (79%) e Pomona (68%). Em todos os 14 municípios amostrados foram detectados animais reagentes a estes sorovares, sendo o município de Olho d'Água das Cunhãs o que apresentou o maior percentual de amostras reagentes (100%) para o sorovar Hardjo, seguido dos municípios de Pedreiras e Trizidela do Vale (97%) e do município de São Luís (87%). Para o sorovar Wolffi os municípios de Bom Lugar, Bernardo do Mearim, Lago da Pedra e Olho d'Água das Cunhãs obtiveram maior

frequência (90%), seguido do município de São Luís (73%). O estudo também evidenciou significativa frequência para o sorovar Pomona nas amostras analisadas dos municípios de Vitorino Freire, Bernardo do Mearim e Pedreiras (87%), São Luís (53%) e com menor frequência, São Luís Gonzaga (23%), conforme demonstrados na (Tabela 9).

Tabela 9- Frequência dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona diagnosticados no exame de Leptospirose realizado em fêmeas bovinas, das bacias leiteiras, por município das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014

Unidades Regionais	Municípios	Nº de Animais	Hardjo		Wolffi		Pomona	
			n	%	n	%	n	%
Bacabal	Bacabal	30	23	77	21	70	21	70
	Bom Lugar	30	25	83	27	90	23	77
	Lago Verde	30	26	87	22	73	18	60
	Olho d' Água	30	30	100	27	90	19	63
	Cunhãs							
	São Luís	30	23	77	16	53	7	23
	Gonzaga							
	Vitorino Freire	30	9	30	17	57	26	87
Subtotal		180	136	76	130	72	114	63
Pedreiras	Bernardo do Mearim	30	28	93	27	90	26	87
	Igarapé Grande	30	26	87	22	73	12	40
	Lago da Pedra	30	28	93	27	90	20	67
	Lima Campos	30	21	70	25	83	23	77
	Pedreiras	30	29	97	28	93	26	87
	Poção de Pedras	30	24	80	24	80	25	83
	Trizidela do Vale	30	29	97	25	83	24	80
Subtotal		210	185	88	178	85	156	74
São Luís	São Luís	30	26	87	22	73	16	53
Subtotal		30	26	87	22	73	16	53
Total		420	347	83	330	79	286	68

Fonte: Elaboração da autora

Ao analisar as possíveis variáveis de riscos para a ocorrência da infecção por leptospirose, frente ao teste estatístico univariado, este demonstrou que a realização de inseminação artificial no rebanho, criação conjunta de caprinos,

ovinos, equinos e caninos nas propriedades e taxa de natalidade de bezerros maior no período seco apresentou associação estatística significativa ($P < 0,05$) aos fatores de risco (Tabela 10).

Tabela 10- Análise univariada dos fatores de riscos associados à infecção pelos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona, em rebanhos bovinos, das bacias leiteiras, das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014 (Continua...)

Variáveis	Descrição	Análise Univariada					
		Reag. (%)		Não reag. (%)		OR (IC-95%)	*P-valor
Realiza	Sim	44	10	40	1	0,9197	0,8068
quarentena	Não	183	44	153	36	(0,5696- 1,485)	
Assistência	Sim	84	20	54	13	1.491	0,0613
Veterinária	Não	110	26	106	25	(0,9853- 2,255)	
Aluguel de pasto	Sim	109	28	95	23	0,5800	0,0911
	Não	62	26	88	49	(0,3123- 1,077)	
Presença de áreas	Sim	183	44	147	35	1,087	0,7218
alagadas na propriedade	Não	48	11	42	10	(0,6824- 1,739)	
Realiza	Sim	37	9	17	4	2,038	0,0276*
inseminação artificial	Não	189	44	177	42	(1,108- 3,751)	
Destino dos fetos abortados e placenta	Enterra	61	15	65	15	0,6657	0,0684
	Não faz nada	172	41	122	24	(0,4376- 1,013)	
Abortamento nos últimos 12 meses	Sim	81	19	69	16	0,9677	0,9168
	Não	148	35	122	29	(0,6482 -1,445)	
Contato de roedores e animais silvestres com alimentação dos bovinos	Sim	98	23	94	22	0,8591	0,4922
	Não	125	30	103	25	(0,5846 -1.262)	

Tabela 10- Análise univariada dos fatores de riscos associados à infecção pelos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona, em rebanhos bovinos, das bacias leiteiras, das Unidades Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, Maranhão, Brasil, 2014 (...Conclusão)

Vacinação contra leptospirose	Sim	43	10	41	10	0,8768	0,6256
	Não	183	44	153	36	(0,5432 -1,415)	
Presença de caprinos, ovinos, equinos e caninos na fazenda	Sim	192	46	180	43	0,4392	0,0136*
	Não	34	8	14	3	(0,2282-0,8455)	
Período com maior taxa de natalidade de bezerros	Seco	131	31	67	25	1,692	0,0097*
	Chuvoso	119	28	103	16	(1,140 -2,513)	
Presença de piquete parição	Sim	175	14	137	33	1,482	0,0931
	Não	50	14	58	14	(0,9548-2,300)	

IC (Intervalo de Confiança): 95%; OR: *Odds Ratio*; *P<0,05

6 DISCUSSÃO

A frequência de aglutininas anti-*Leptospira* spp encontrada nas bacias leiteiras das Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís foi elevada, tanto para rebanhos como para animais, dado este que reveste-se de elevada importância, considerando que a leptospirose é uma doença que causa inúmeras perdas para a pecuária, tanto de ordem sanitária como econômica, além de causar sérios agravos à saúde pública. As razões dessa alta prevalência e distribuição de *Leptospira* spp nas áreas amostradas podem estar relacionadas ao tipo de exploração e ao sistema de criação semi-intensivo dos animais.

A leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros pode estar relacionada à densidade animal, pois os animais convivem mais aglomerados, logo mais expostos, direta ou indiretamente ao micro-organismo ou à presença do agente etiológico no ambiente em condições climáticas satisfatórias, principalmente temperatura e umidade. De acordo com Thrusfield (2007), a aglomeração de animais favorece a disseminação de doenças para os suscetíveis no interior das populações, na medida em que o número de animais e o tempo de exposição aumentam.

A alta frequência obtida neste estudo, em relação ao sorovar Patoc, pode estar associada à presença de roedores e animais silvestres no ambiente. Conforme Cubas et al. (2007), a constante presença dessas espécies em áreas rurais atuam como importantes reservatórios.

Outro aspecto importante, são as alterações desordenadas do sistema ecológico devido às ações antrópicas, o que condiciona na mudança de comportamento dos animais em busca de outros ecossistemas, tal fato, possibilita a disseminação das leptospirosas até o alcance de novos hospedeiros e/ou reservatórios, inclusive o homem. Genovéz (2009), cita que na zona rural, as peculiaridades do habitat e a presença de animais silvestres possuem relevância na transmissão da leptospirose frente às criações de animais de produção.

Além do sorovar Patoc, variantes sorológicas encontradas neste estudo como Shermani, Grippotyphosa, Hebdomadis, Tarassovi, Autumnalis, Pyrogenes, Copenhageni, Australis, Canicola, Castellonis, Icterohaemorrhagiae, Panama, Sentot e Andamana remetem, também, a suspeita da existência de animais selvagens de vida livre nas propriedades. Silva et al. (2010), em São Paulo, ao pesquisarem anticorpos anti-*Leptospira* spp em animais domésticos e silvestres constataram que,

gambás (*Didelphis albiventris*) e cervídeos podem ser reservatórios das sorovariedades Patoc, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Andamana e Canicola para animais domésticos como bovinos, caprinos, ovinos, suínos, equinos e cães. Estas sorovariedades encontradas são acidentais e suas descrições estão associadas à animais silvestres, que de acordo com Santa Rosa et al. (1975;1980), levantam a suspeita do envolvimento dessas espécies da fauna selvagem como reservatórios dessas sorovariedades para os bovinos.

O sorovar Copenhageni também foi encontrado neste estudo, porém, com frequência bem superior à obtida por Pimentel et al. (2009), em Aracaju/SE, de 4/32 (12,5%) ao diagnosticar leptospirose em mamíferos neotropicais, como macacos-prego (*Cebus libidinosus*), macacos-prego-do-peito-amarelo (*Cebus xanthosternus*), onças-suçuaranas (*Puma concolor*), onça-pintada (*Panthera onca*), raposa (*Cerdocyon thous*), guaxinins (*Procyon cancrivorus*) e quatis (*Nasua nasua*), o que reforça a participação dos animais selvagens como reservatórios ou portadores de zoonoses na natureza e, que podem estar presentes em áreas rurais (ACHA; SZYFRES, 2003).

Diversos estudos epidemiológicos realizados no Brasil demonstram a importância de animais domésticos e silvestres na cadeia epidemiológica de transmissão da leptospirose. Paixão et al. (2011), em São Paulo, encontraram 14/14 (100%) de animais soro positivos para Australis, (86%) para Autumnalis, (66%) para Shermani, (44%) para Sentot, (55%) para Cynopteri, Butembo, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Patoc e Canicola, e (22,2%) para Tarassovi.

Rolim et al. (2013), em Pernambuco, detectaram 55/412 (13,3%) bovinos reagentes, destes (10,9%) e (9,1%) foram soro positivos às variantes Hebdomadis e Grippotyphosa, respectivamente. Para Vasconcellos (1997), estes sorovares são importantes para o rebanho bovino leiteiro por ocasionarem mastite.

Destaca-se neste estudo a importância da variante sorológica Icterohaemorrhagiae. Comprovou-se que (90%) dos ordenhadores estão expostos a um ambiente insalubre no momento da ordenha, com presença de fezes, urina e áreas lamacentas. Este sorovar tem relevância para a Saúde Pública, principalmente se o ambiente estiver contaminado com urina de animais infectados (SILVA et al., 2012).

Quanto às sorovariedades Hardjo, Wolffi e Pomona suas ocorrências indicam que, possivelmente os rebanhos bovinos apresentam resposta imunológica

ativa à leptospirose. Esses sorovares são reconhecidos como patogênicos para esta espécie, por ocasionarem transtornos reprodutivos e, segundo Almeida (1999), são os sorovares mais frequentes encontrados nas Américas. A variante sorológica Hardjo tem sido considerada mundialmente a maior causadora de abortos nos bovinos, cuja principal forma de transmissão é o contato direto entre os animais e, a sua disseminação independe de região ou de fatores climáticos (BOLIN; ALT, 1999; ARAÚJO et al., 2005).

Referente à frequência elevada para os sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona nos rebanhos e animais das bacias leiteiras das Regionais de Bacabal e Pedreiras, possivelmente seja devido ao tipo de exploração, onde predomina o sistema de criação semi-intensivo. Langoni et al. (2000) relataram que animais de produção leiteira apresentam 1,9 vezes mais reagentes positivos quando comparados aos destinados à produção de carne. Tais registros explicam-se em razão de que rebanhos criados muito próximos uns dos outros aumenta em grande parte o contato com animais infectados, o que possibilita uma menor proteção e maior disseminação do agente etiológico no ambiente (ELLIS, 1994; FAINE, 1999; TOMICH, 2007).

Outro fator relevante que pode ter contribuído para tais frequências elevadas foi a aquisição de bovinos com a finalidade para reprodução e reposição de matrizes, o que ocorre habitualmente nestas regiões, tendo em vista que a compra de animais pode representar fator de risco para a introdução da enfermidade nos rebanhos. A obtenção ocorre, inclusive sem documentação zoonosológica, como o atestado de vacinação e exame laboratorial referente à leptospirose. Enfatiza-se que o acompanhamento do estado de higiene dos animais é imprescindível, para que medidas sanitárias possam ser adotadas permitindo o rastreamento e a eliminação de rebanhos e animais soro reagentes.

Foi observado ainda, que (95%) dos proprietários não separavam os animais que abortaram, bem como, o material resultante de abortamento, permanecendo os mesmos no plantel. Este procedimento incorreto de manejo aumenta o potencial de exposição à *Leptospira* spp e consequentemente eleva a frequência da doença nos rebanhos.

Observou-se também que há comercialização de sêmen de reprodutores sem o controle higiênicossanitário. Conforme Costa et al. (1998) e Radostits et al. (2002) essa conduta possibilita a transmissão do agente por meio do sêmen

proveniente de touro infectado, embora o sêmen contenha antibiótico, o glicerol e armazenamento em nitrogênio líquido contribuem para a conservação da bactéria.

Destaca-se que as Regionais de Bacabal e Pedreiras localizam-se geograficamente na região Central do Estado havendo, portanto, maior possibilidade de movimentação de animais com a divisa entre os Estados do Pará, Piauí e Tocantins. Levantamentos soro epidemiológicos realizados por Chiebao (2010), no Estado do Pará, apresentaram frequência para rebanhos e animais de 169/171 (98,8%) e 2.208/3.371 (65,5%), respectivamente; já Mineiro et al. (2007), no Estado do Piauí obtiveram 16/16 (100%) para rebanhos e Mineiro et al. (2010), na bacia leiteira de Parnaíba/PI diagnosticaram leptospirose em 15/18 (83,33%) dos animais. Também Araújo (2010), em Aragominas/TO, obteve percentuais de 189/247 (76,5%) para animais.

De acordo com WHO (2003), a aquisição e trânsito de animais contribuem como fonte permanente de infecção aos susceptíveis, assim como aglomerações de animais em exposições, leilões e vaquejadas podem predispor à infecção por *Leptospira* spp, eventos muito comuns nas Regionais estudadas.

As frequências elevadas encontradas podem ainda estar atribuídas à idade das fêmeas, pois quanto maior a idade do animal, maiores são as chances de exposição ao agente, sobretudo na idade reprodutiva. Na idade adulta os animais estão no ápice das suas atividades produtivas e reprodutivas, portanto, o risco é maior (ALONSO-ANDICOBERRY et al., 2001; HIGINO et al., 2014).

A população amostrada poderia estar com o sistema imunológico comprometido por diversos fatores, como, desequilíbrio nutricional ou após abortamento, o que demonstra frequências altas dos sorovares identificados. Animais com baixa imunidade encontram-se mais predispostos à aquisição de enfermidades (ALONSO-ANDICOBERRY et al., 2001).

Na Regional de São Luís, a frequência encontrada nos rebanhos bovinos, para o sorovar Hardjo, foi inferior em relação às Regionais supra citadas, o que pode estar relacionado ao menor trânsito de animais e o número inferior de amostras analisadas. No entanto, foi considerada frequência elevada para animais, o que pode estar associado à presença dos mesmos nas propriedades com a forma assintomática da doença. A ausência de sinais clínicos evidencia a importância de animais assintomáticos na epidemiologia da leptospirose, pois, mesmo sem

apresentarem indícios, são portadores e podem eliminar o agente por tempo indeterminado contaminando o ambiente (CAMPOS Jr., 2006).

Vale advertir, que mesmo o teste laboratorial negativo não garante que o animal não esteja infectado, pois pode encontrar-se no período de incubação, o que reforça verificar a procedência dos animais (MELO, 2009). Outro aspecto relevante é a localização das propriedades próximas ao lixão (Aterro da Ribeira), local de destinação final de resíduos gerados por este município, que pode também ter contribuído para a frequência elevada, uma vez que os animais poderiam ter acesso a aquele ambiente.

Com relação à frequência estudada nos rebanhos bovinos por municípios das bacias leiteiras das Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, ressalta-se que o sorovar Hardjo não foi encontrado em Vitorino Freire e São Luís. A variante sorológica Pomona também não foi detectada em rebanhos leiteiros dos municípios de Trizidela do Vale, Pedreiras, Lima Campos e São Luís. A ausência desses sorovares podem estar relacionados ao tipo de manejo sanitário adotado por cada propriedade, a não introdução de animais infectados por estas variantes sorológicas e conseqüentemente a não exposição dos mesmos à ambientes com a presença do agente etiológico.

Na interpretação dos testes sorológicos devem ser considerados vários fatores: reações cruzadas, títulos de anticorpos induzidos por vacinação, perda de consenso entre o título de anticorpos e os indicativos de infecção ativa. Os anticorpos produzidos no animal, em resposta à infecção com um dado sorovar de *Leptospira*, frequentemente reage (reação cruzada) com outro sorovar de *Leptospira*. Entretanto, uma fêmea bovina infectada com um único sorovar, provavelmente tenha anticorpos para mais que um sorovar no teste de aglutinação. Em alguns casos, esse padrão de reação cruzada é previsível, tendo como base, o seu parentesco entre os vários sorovares do gênero *Leptospira* (FAINE, 1999; LEVETT, 2001).

Padrões de reações cruzadas variam bastante, entre as espécies animais e entre indivíduos, dentro de uma mesma espécie. Geralmente o sorovar infectante é assumido como o sorovar para o qual aquele animal desenvolve o maior título. As reações paradoxais podem ocorrer com o teste de aglutinação, no início do curso da infecção aguda, com uma acentuada resposta de anticorpos aglutinantes para um sorovar outro que não o infectante (RADOSTITS, 2002).

O diagnóstico da leptospirose baseado numa única amostra deve ser realizado com cautela e com total consideração do quadro clínico e histórico de vacinação. Na leptospirose aguda o aumento de título na ordem de quatro vezes superior é frequentemente observado em amostras pareadas. Entretanto os hospedeiros de manutenção estão eliminando leptospirosas com títulos $>1:100$. Por isso, um título baixo de anticorpos não necessariamente, determina o diagnóstico de leptospirose (LEVETT, 2001; BOLIN, 2003; BRASIL, 2005).

Dentre os fatores de risco associados à infecção dos animais referente aos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona observou-se que a variável realização de inseminação artificial em fêmeas bovinas teve associação estatística significativa, tal fato pode estar relacionado com a comercialização de sêmen oriundos de reprodutores de rebanhos infectados, onde não é realizada medidas de controle e prevenção contra leptospirose. A *Leptospira* spp pode ser transmitida através da inseminação artificial, pois, as bactérias sobrevivem à temperatura de congelamento do sêmen e a aquisição de um produto com qualidade sobrevém somente de locais que efetuam testes por meio de técnicas moleculares, como o PCR. A transmissão do agente pela inseminação artificial é minimizada desde que as centrais atendam os critérios preconizados pela OIE em relação à saúde do touro doador (HEINEMANN et al., 2000; CASTRO, 2012).

A variável presença de caprinos, ovinos, equinos e caninos também foi considerada como fator de risco significativo. Usualmente, a criação consorciada com outras espécies domésticas na mesma propriedade constitui-se fonte constante de infecção aos suscetíveis (LILENBAUM, 1996; RADOSTITS et al., 2000).

Alguns autores versam que os ovinos atuam como hospedeiros acidentais (ELLIS, 1994; LILENBAUM, 2003). Silva et al. (2007) cita que a espécie ovina pode atuar como hospedeiro de manutenção do sorogrupo Autumnalis, infectando bovinos, equinos e até mesmo a espécie humana. Segundo Genovéz (2009), há certa evidência que os ovinos também sejam hospedeiros de manutenção da sorovariedade Hardjo. Escócio et al. (2010), em Sorocaba/SP, realizaram estudo na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos (20/80) e bovinos (1/3) e, detectaram 21/83 (25,3%) com prevalências de Hardjo e/ou Wolffi de 4/21 (19%).

Os equinos criados nas propriedades são empregados com a finalidade de transporte, tração e esporte. Já os cães são utilizados junto ao manejo dos rebanhos, tais condições são frequentes nas regiões estudadas. A criação conjunta

destas espécies com os bovinos, caso infectadas por *Leptospira* spp pode ser considerado um fator relevante. Vasconcellos (2003) e Araújo (2010) revelaram que a exposição de equinos e cães ao contato com coleções hídricas e com restos de partições contaminadas pode elevar os riscos de disseminação da doença na propriedade.

A maior taxa de natalidade de bezerros no período seco também foi considerada um fator de risco estatisticamente significativo. Sugere-se que esta ocorrência possa estar relacionada com a transmissão de *Leptospira* spp via transplacentária. Segundo Speelman e Hartskeerl (2008) e Philip (2011), esta condição pode ocorrer, pois, existe maior concentração das bactérias no útero e placenta durante o período gestacional. As fêmeas cobertas no período chuvoso tem maior probabilidade de serem infectadas em virtude das condições edafoclimáticas favoráveis para a disseminação do agente etiológico, havendo consequentemente transmissão do micro-organismo aos neonatos.

Outras variáveis que apesar de não terem apresentado associação estatística significativa neste estudo ($P>0,05$), evidenciaram considerável associação ($OR>1$) e, portanto, merecem destaque foram: ausência de assistência veterinária, presença de áreas alagadas e de piquetes maternidade nas propriedades.

A assistência veterinária é de grande importância na sistematização do controle sanitário dos rebanhos, com o propósito de evitar a introdução do agente infeccioso. Foi constatado que (98%) dos proprietários não adotavam medidas sanitárias adequadas. Faine (1999) cita que a movimentação de animais sem procedência constitui-se como fator de risco importante na disseminação da enfermidade, portanto, orientações veterinárias quanto à aquisição de animais com a Guia de Trânsito Animal (GTA), atestado de vacinação e exame sorológico, realização de quarentena, identificação e separação de animais infectados são medidas imprescindíveis. A destinação correta de fetos, restos placentários e de carcaças, desinfecção do ambiente, das instalações e dos equipamentos, vacinação dos suscetíveis de modo a garantir elevado nível de imunidade, controle da inseminação artificial e adoção de medidas terapêuticas, quando necessárias, também são fatores mitigadores à introdução do micro-organismo nos rebanhos.

Observou-se ainda que em (100%) das unidades epidemiológicas havia presença de áreas alagadas, como córregos, igarapés e rios, sendo os açudes a principal fonte de água para todas as espécies domésticas presentes. Brod e

Fehlberg (1992) descreveram que o acesso a fontes de água contaminada e alagamentos aumenta o risco de infecção por *Leptospira* spp. A presença de matéria orgânica em água e solos contaminados pela urina de animais infectados e o pH de solos ligeiramente neutros revestem-se de importância na perpetuação de focos de leptospirose (RADOSTITS et al., 2000).

A variável presença de piquetes de parição nas fazendas demonstrou elevada associação. Foi observado que os piquetes não continham estruturas adequadas, o que impossibilitava a higienização e desinfecção correta dos mesmos. As áreas externas apresentavam solo lamacento, fezes e urina, propiciando ambiente favorável para a sobrevivência das leptospiros. As espécies patogênicas não se multiplicam, mas sobrevivem nestes ambientes, com pH levemente alcalino, salinidade baixa e com ausência de radiação ultravioleta. Os (80%) entrevistados relataram que não realizavam o acompanhamento das fêmeas próximo à parição. As bactérias nos animais prenhes, após atingirem o sistema sanguíneo ou linfático, alcançam o útero e a placenta e em seguida o feto, que vem a óbito, sendo expulso cerca de 24 depois (GENOVÉZ, 2009). Os animais que abortavam não eram separados imediatamente permanecendo nos piquetes fetos, restos placentários e secreções uterinas.

No presente estudo foi observado que o acondicionamento dos alimentos destinados aos animais era incorreto, geralmente em áreas com sujidades, e com presença de equipamentos e utensílios em desuso, que pode contribuir como abrigo para os roedores. O armazenamento inadequado de ração e suplementos alimentares é um dos principais fatores que contribuem com a presença e permanência de roedores em depósitos, principalmente quanto à inexistência de medidas profiláticas, como o uso de rodenticidas (SILVA et al., 2010).

A ocorrência de aborto nos últimos 12 meses não foi considerada fator de risco associada à infecção pelos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona, no entanto, são variantes sorológicas relacionadas à esfera reprodutiva, principalmente em fêmeas bovinas leiteiras. O sorovar Pomona possui elevada patogenicidade, ocasionando icterícia e abortamento. A infecção pelo sorovar Hardjo tem efeito direto sobre a fertilização interferindo na função do corpo lúteo, através da diminuição dos níveis de progesterona, o sorovar Wolffi está comumente associado ao Hardjo (DHALIWAL et al., 1996; VASCONCELLOS, 1997). A ocorrência de abortamento é indicativo de

infecção, pois, é um dos principais sinais clínicos da doença na espécie bovina e que encontra-se endêmica no rebanho (ACHA; SZYFRES, 2003).

As sorovarietades Hardjo, Wolffi e Pomona estão presentes em inquéritos realizados em diversas regiões do Brasil. Sarmento et al. (2012) ao diagnosticarem leptospirose em oito estados brasileiros, obtiveram frequências de (43%, 9,96% e 4,28%), respectivamente.

Silva et al. (2012) ao realizarem estudo soro epidemiológico em quatro circuitos no Estado obtiveram prevalências no circuito I - Regional de São Luís para rebanhos e para animais, respectivamente, de 101/136 (74,26%) e 499/841 (58,30%) e no circuito II - Regionais de Bacabal e Pedreiras, prevalências para rebanhos e animais de 183/238 (76,89%) e 973/2.582 (33,41%), simultaneamente. Os sorovares Hardjo e Wolffi estiveram frequentes com percentuais para rebanhos e animais na Regional de São Luís de 78/136 (57,35%) e 347/841 (41,63%), já nas Regionais de Bacabal e Pedreiras foram representativos para rebanhos e animais com prevalências de 120/238 (50,42%) e 523/2.582 (22,20%), respectivamente.

A prática de aluguel pasto e o destino inadequado dos fetos abortados juntamente com placentas não apresentaram valor estatisticamente significativo na análise univariada de risco para leptospirose entre os animais, entretanto, estas variáveis não devem ser desconsideradas. Estes fatores contribuem como fonte permanente de infecção aos susceptíveis. O contato de animais com pastos contaminados, principalmente com urina, restos placentários e fetos atuam como fonte de infecção em potencial. As espécies patogênicas possuem um período de sobrevivência no solo de até 180 dias (FAINE et al., 2000; WHO, 2003; LEVETT, 2001; HAMOND, 2010).

A vacinação contra leptospirose neste estudo não apresentou significância estatística, de fato somente (5%) dos questionados revelaram que vacinavam o rebanho, porém, sem utilizar o cronograma de vacinação corretamente. Cabe enfatizar que a utilização de um programa de vacinação é uma das principais ferramentas na prevenção e no controle da leptospirose. De acordo com Wang et al. (2007), o sucesso dos programas de vacinação está associado à estudos epidemiológicos consecutivos para o monitoramento da ocorrência de diversas variantes anti-*Leptospira* em uma população. Segundo Herrmann (2012), a imunização atua na prevenção de sinais clínicos como aborto, morte embrionária e outros sinais característicos da doença, permitindo o controle sanitário do plantel,

além de que possui a vantagem com relação ao custo de cada dose por ser significativamente menor do que a dose utilizada com o uso de antibioticoterapia.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo pode-se concluir que:

- A frequência da leptospirose obtida para rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, MA foi elevada;
- O sorovar do complexo *Leptospira* spp mais frequente em rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, MA foi o Patoc;
- As sorovariedades Hardjo, Wolffi e Pomona foram frequentes nos rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regionais de Bacabal e Pedreiras, MA;
- As sorovariedades Wolffi e Pomona não foram detectadas nos rebanhos bovinos da bacia leiteira da Regional de São Luís, MA;
- Os fatores de risco associados à soro positividade para leptospirose foram: realização de inseminação artificial, presença de caprinos, ovinos, equinos e caninos nas propriedades e maior taxa de natalidade de bezerros no período seco;
- As variáveis ausência de assistência veterinária, presença de áreas alagadas e de piquetes maternidade nas propriedades não apresentaram associação estatística significativa, porém, evidenciaram considerável força de associação;
- O mapeamento de focos demonstrou que a leptospirose encontra-se amplamente difundida no rebanho bovino das bacias leiteiras das Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, MA.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da biodiversidade do agente etiológico e da frequência elevada dos sorovares encontrados nos rebanhos bovinos das bacias leiteiras das Regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís, MA, fica evidenciado a importância de se considerar que a leptospirose é endêmica nestas regiões, portanto, sugere-se:

- Implantar e implementar medidas sanitárias através dos Órgãos de Defesa, com vistas na imunoprofilaxia, entre outras estratégias de controle, para a detecção precoce e o fortalecimento na redução de focos da Leptospirose bovina no Estado;
- Elaborar sistema de informações como suporte para criação de banco de dados epidemiológico sobre a enfermidade;
- Realizar ações de Educação Sanitária abrangendo as interfaces humana-animal-ecossistema, com a participação dos produtores, educadores, alunos, organização da sociedade civil e população em geral;
- Efetuar inquérito soro epidemiológico para leptospirose em animais silvestres de vida livre e no grupo de risco ocupacional (ordenhadores), nas Regionais amostradas;
- Adotar medidas de biossegurança, principalmente por médicos veterinários, laboratoristas, ordenhadores, criadores, tabalhadores de matadouros, como forma de evitar o contato direto com a fonte de infecção;
- Promover interação entre as instituições das esferas federais, estaduais e municipais, como universidades, setores da saúde, agricultura, meio-ambiente, entre outros atores, para elaboração de diretrizes voltadas para a sanidade e à proteção da saúde animal e do homem;
- Estimar o impacto econômico da Leptospirose bovina no estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3 ed. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, 2003. v. 1, p. 28-45.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B.; FAINE, S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Infect. Immun.** 14:703-708p., 1976.
- ADLER, B.; FAINE, S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. **Infect. Immun.** 17: 67-72, 1977.
- ADORNO, O. J. C. Leptospirose bovina. **Monografia** (Curso de Pós-graduação “Lato Sensu” em Reprodução de Bovinos). Universidade Castelo Branco, Piracicaba, SP, 2006.
- AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MARANHÃO. Coordenadoria de Defesa Animal. Programa de Prevenção e Erradicação da Febre Aftosa. **Efetivo de bovídeos leiteiros do Estado do Maranhão**. Arquivo impresso. Acesso em: 05.jun.2012.
- AGUIAR, D. M. et al. Seroprevalence of *Leptospira* spp in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 2, p. 102-104, 2006.
- ALMEIDA, L. P. Epidemiologia da leptospirose: fontes de infecção e vias de transmissão. **Cadernos Didáticos 61 UFV**, Viçosa, MG, 32 p., 1999.
- ALMEIDA, K. V. et al. Aglutininas anti-*Leptospíricas* em rebanho bubalino no estado do Maranhão, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 24., 2014, Vitória. **Anais...** Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

ALONSO-ANDICOBERRY, C.; GARCÍA-PEÑA, F. J.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. **Investig. Agr. Prod. Sanid. Anim.**, v. 16, p. 205-225, 2001.

ALVES, C. J. et al. Aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina na Microrregião de Pombal, Paraíba, semi-árido do Brasil. **Agrop. Téc.**, v. 23, n. 1-2, p. 21-26, 2002.

ANZAI, T. et al. Evaluation of the Field application of PCR in the eradication of contagious equine metritis from Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 64, p. 999-1002, 2002.

ARAÚJO, I. G. R. Pesquisa de aglutininas anti-*leptospíricas* em soros sanguíneos de asininos de veículos de tração animal na cidade de São Luís, MA. 2000. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade do Estado do Maranhão, São Luís, 2000.

ARAÚJO, V. E. M. et al. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005.

ARAÚJO, B. M. Soroepidemiologia da infecção por *Leptospira* spp em bovinos, equídeos, caninos e trabalhadores rurais em assentamento no município de Aragominas, Tocantins, Brasil. 2010. 112f. **Tese** (Doutorado em Veterinária). Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2010.

ASSOCIAÇÃO COMERCIAL DO MARANHÃO. **Informe Técnico, 2013**. Disponível em: <<http://www.acm-ma.com.br/noticias/654-maranhao-esta-produzindo-mais-leite-e-tendencia-e-de-expansao>>. Acesso em: 24.nov.2013.

ÁLVAREZ, M. A. L.; CERVANTES, L. P. M.; ROSAS, D. G.; VASQUEZ, C. N.; GARCIA, F. S. Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina em México considerando las regiones ecológicas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 57, n. 1, p. 28-31, 2005.

AVELAR, K. E. S.; PEREIRA, M. M. Espiroquetídeos. In: TRABULSI, L. R.; ALERTUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 405-408.

AZEVEDO, P. M. M. R.; AZEVEDO, A. R. Eficiência reprodutiva em bovino de leite. **Rev. Cient. Prod. Anim.**, v. 3, n. 2, p. 48-61, 2001.

BAL, A.E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R.A.; MEZA, B.J.; KURVER, H.; TERPSTRA, W.J. Detection of Leptospirosis in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.8, p.1894-1898, 1994.

BARCELLOS, C.; LAMMERHIRT, C. B.; ALMEIDA, M. A. B.; SANTOS, E. Distribuição espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1283-1292, set./out., 2003.

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

BEZERRA, D. C. et al. Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em soros sanguíneos de asininos (*Equus asinus*) e de condutores de veículos de tração animal na cidade de São Luís, MA, Brasil. **Ciê. Animal Bras.**, v. 11, n. 4, p. 931-937, 2010.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis.**, v. 3, p. 757-71, 2003.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars Vet. Med. Surgery** (Small animal), Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Clinical signs, diagnosis and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Practitioner**, v. 33, p. 50-55, 1999.

BOLIN, C. A. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. Proceedings of the Western Dairy Management. **Conference Reno**, p. 155-160, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Manual de leptospirose**. 2. ed. Brasília, DF, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica – Leptospirose**. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, Caderno 8, CID10:A27, p.502-520. Brasília/DF, 2005. Disponível em: Biblioteca Virtual do Ministério da Saúde: <<http://www.saude.gov.br/bvs>>. Acesso em: 06.nov.2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 50, de 24 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, n. 186, 25 set. 2013. Seção 1, p. 47.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 16, de 16 de junho de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, n. 186, 17 jun. 2014. Seção 1.

BROD, C. S. et al. Leptospirose bovina na Região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 14, p. 15-20, 1994.

BROD, C. S.; FEHBERG, M. F. Epidemiologia da Leptospirose em bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, p. 239-45, 1992.

BROOKS, G. F. et al. Spirochetes & Other Spiral Microorganisms. In: Brooks, G. F et al. (Eds). **Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology**. USA: Mc Graw Hill; 2010, p. 301-312.

CACCHIONE, R. A. Leptospiras y técnicas de laboratorio. Secretaria de Estado de Agricultura y Ganadería de La Nación. Instituto Nacional de Tecnología

Agropecuaria. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. **Rev. Investigación Ganadera**, v. 14, n. 16, p. 105-124, 1962.

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

CARDOSO, M. V.; LARA, M. C. C. S. H.; CHIEBAO, D.; GABRIEL, F. H. L.; VILLA LOBOS, E. M. C.; PAULIN, L. M. Determinação da condição sanitária de rebanhos caprinos e ovinos na região Sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. In: 35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA; 2008. **Anais...** Gramado, RS, 2008.

CARVALHO, S. M. et al. Leptospirosis seroprevalence and risk factors for sheep in Maranhão state, Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 46, p. 491- 494, 2014.

CASTRO, V. et al. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 3-11, 2008.

CASTRO, V. Leptospirose em bovinos. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal. **Inst. Biol.**, 2012. Disponível em: < <http://www.biologico.sp.gov.br>>. Acesso em: 24.nov.2013.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, Ramos Mejia. **Procedimientos para estudios de la prevalencia por amostra**. Ramos Mejia, Buenos Aires, 35p., (Nota técnica), 1979.

CHAUDHRY, J. I. et al. Seroprevalence of leptospirosis in buffaloes. **Buffalo Journal**, v. 12, n. 1, p. 65-71, 1996.

CHIDEROLI, R. T. et al. Prevalência da leptospirose em bovinos, caninos e humanos na área rural do município de Jataizinho, Paraná, Brasil. XIX In: EAIC, 19., 2010, Guarapuava. **Anais...** Guarapuava, UNICENTRO, 2010.

CHIEBAO, D. P. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella* e anti-*Leptospira* spp em bovinos do Pará: estudo de possíveis variáveis para ocorrência de infecção. 109f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CINCO, M. Novos inquéritos sobre a patogenicidade de leptospira: evasão de defesas dos hospedeiros. **Nova Microbiologia**, v. 33, p. 283-292, 2010.

COELHO, E. L. M. Diagnóstico de *Leptospira* spp utilizando as técnicas de soroaglutinação microscópica e imunohistoquímica. 2011. 60f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PULSSELY, P. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. **Appl. Microbiol.** v. 25, p. 976-980, 1973.

CORCHO et al. Leptospiroses humana, uma enfermidade esquecida. **Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**. Havana, Cuba, 2008.

COSTA, M. C. R. et al. Avaliação da imunidade cruzada entre *L. hardjo* e *L. wolffi*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 50, n. 1, p. 11-17, 1998.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007, p. 736-741.

CURCI, V. C. L. M. Atividade sanitária em rebanhos leiteiros de agricultura familiar da Região Noroeste do Estado de São Paulo. **Pesq. Tecnol.**, v. 7, n. 18, 2010. Disponível em: <www.aptaregional.sp.gov.br>. Acesso em: 24. jan. 2014.

DADKHAH, M. A.; YEGANEHZAD, M. Seroprevalence of leptospiral infection in cows in farms of Sarab, Iran. **Research Opinions Animal Vet. Scien.** v. 1, n. 7, p. 456-458, 2011.

DHALIWAL, G. S. et al. Reduced conception rate in dairy cattle associated with serological evidence of *L. interrogans* sorovar *hardjo* infection. **Vet. Rec.**, v. 139, p. 110-114, 1996.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 10, p. 463-478, 1994.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Principais países produtores de leite no mundo.** Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>>. Acesso em: 19.nov.2012.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **J. Immunol.**, v. 102, p. 129-135, 1971.

ENRIETTI, M. A. Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospiras em murídeos, caninos e suínos no Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, p.311-342, 2001.

ESCÓCIO, C.; GENOVÉZ, M, E.; CASTRO, PIATTI, R. M.; GABRIEL, F. H. L.; CHIEBAO, D. P. AZEVEDO, S. S. VIEIRA, S. R.; CHIBA, M. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP. **Arq. Inst. Biol.**, v.77, n.3, p.371-379, jul./set., 2010.

ESPÍ, A. et al. Serological prevalence to six leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain). **Epidemiol. Infect.**, v. 124, p. 599-602, 2000.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature.** Disponível em: <<http://www.bacterio.net/leptospirosis.html>>. Acesso em: 07.out.2013.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/leptospirosis.html>>. Acesso em: 10.jul.2014.

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

FAINE, S. **Leptospira and Leptospirosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

FAINE, S. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MedSci, 1999.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MedSci, 2000.

FARIA, C. P. et al. Prevalência de Leptospirose bovina e sua correlação com os distúrbios reprodutivos apresentados no município de Itamonte-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2008. **Anais...** Gramado, 2008.

FAVA, C. Del. et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 25-33, 2003.

FAVERO, M. et al. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 Estados do Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.

FAVERO, A. C. M. et al. Sorovares de Leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Cien. Rural**, v. 32, n. 4, p.613-619, 2002.

FERREIRA, B. C. et al. Frequência de animais sororreagentes para *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. **Vet. Not.**,Uberlândia, v. 18, n. 2 (supl.), p. 41-44, jul./dez., 2012.

FIGUEIREDO, A. O. Leptospirose bovina: prevalência, variáveis de risco e sorovares predominantes em rebanhos de Mato Grosso Sul, Brasil. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2007.

FIGUEIREDO, A. O. et al. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 5, p. 375-381, 2009.

FLETCHER, W. Recent work ou leptospirosis, tsugmushi disease and tropical typhus in the Federated Maloy States. Trav. Roy Soc. Med. Hug., 21^a.m, 267 – 87, 1928. In: **Manual sobre metodos de la laboratorios para leptospirose**. Centro Panamericano de Zoonosis (Nota Técnica, 9, 1928).

FRAGA, T. R. Estudo de potenciais antígenos vacinais de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. 2009. 149f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FREITAS, D. C.; LACERDA, J. S.; LACERDA, J. P. G. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.** Univ. São Paulo, v. 6, n. 1. p. 81-83, 1957.

GALTON, M. M. et al. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 81-85, 1965.

GAMAGE, et al. Carrier Status of Leptopirosis among cattle in Sri Lanka: A Zoonotic Threat to Public health. **Short Communication**. Transboundary and Emerging Diseases, 2014.

GARCIA, M.; DELLA LIBERA, M. M.; BARROS FILHO, I. R. **Guia on line de Clínica Buiátrica 2012**. Disponível em: <<http://www.mgar.com.br/clinicabuiatrica>>. Acesso em: 24.nov.2013.

GAUMONT, R.; TRAP, D. National situation of leptospirosis in the United Kingdom. In: ELLIS, W. A.; LITTLE, T. W. A. (ed.). **Present state of leptospirosis diagnosis and control**. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 1986, p. 179-184.

GENOVÉZ, M. E. Leptospirose: uma doença de ocorrência além da época das chuvas. **Divulg. Técn. Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1-3, jan./jun., 2009.

GÓMEZ, R. G. **Enciclopédia Bovina**. Facultad de Medicina Veterinária y Zootecnia-UNAM. 1ª ed., 420p., 2008.

GOMES, J. P. **Gênero *Leptospira* spp.** Favet/UFRGS. 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Leptospira%204-2013-1.pdf>>. Acesso em: 14.ago.2013.

GOMES, M. J. P. Gênero *Leptospira* spp **Microbiologia Clínica Veterinária**. Favet/UFRGS, 2014. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C6%AAnero%20Leptospira%302-2014-1.pdf>>. Acesso em: 01.08.2014.

GONÇALVES, D. DIB. et al. **Leptospirose em bovinos de pequenas propriedades rurais do município de Jataizinho/PR**, 2007. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/237500546_leptospirose_em_bovinos_de_pequenas_propriedades_rurais_do_municipio_de_Jataizinho_\(PR\)](http://www.researchgate.net/publication/237500546_leptospirose_em_bovinos_de_pequenas_propriedades_rurais_do_municipio_de_Jataizinho_(PR))>. Acesso em: 24 nov. 2013.

HAMOND, C. Avaliação do impacto da *Leptospira* no desempenho atlético de equinos. **Dissertação** (Mestrado Ciência Animal). Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2010.

HANSON, L. E. Immunology of bacterial diseases, with special reference to leptospirosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 170, n. 9, p. 991-994, 1977.

HARTSKEEL, R. A. Leptospirosis: Current Status and future Trends Indian. **J. Med. Microbiol.**, v. 24, n. 4, p. 309, 2009.

HASHIMOTO, V. Y.; GARCIA, J. L.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, F. G.; ALVES, L. A.; FREITAS, J. C. Prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp em bovinos,

caninos, equinos, ovinos e suínos do município de Jaguapitã, estado do Paraná, **Brasil. Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 521-524, jul/set., 2010.

HASHIMOTO, V. Y. et al. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp em rebanhos bovinos da Região Centro-Sul do Estado do Paraná. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 2, p. 99-105, fev., 2012.

HEINEMANN, M. B. et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovares in bovine semen by polymerase chain reation and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbioly**, Amsterdam, v. 73, p. 261-267, 2000.

HERRMANN, G. P. et al. Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 13, n. 1, p. 131-138, jan./mar., 2012.

HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica no Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 81, n.1, p. 86-94, 2014.

HOMEM, V. S. F. et al. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia Oriental Brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 2, p. 173-180, mar./abr., 2001.

HURTADO, C. B.; URIBE, A. O.; TOUS, M. G. Seroepidemiología de la leptospirosis em bovinos com transtornos reproductivos em el município de Montería, Colombia. **Rev. Med. Vet.**, n. 26, jul./dec., p. 47-55, 2013.

IBGE. Diretoria de Pesquisa. Coordenação de Agropecuária. **Pesquisa da pecuária municipal 2012**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticiavisualiza.php?id_notica=1761&id_pagina=>. Acesso em: 22.out. 2013.

IBGE. Indicadores IBGE. **Indicadores populacionais dos estados brasileiros**. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=211130&idtema=11>>

9&search=maranhao%7Csao-luis%7Cestimativa-da-populacao-2013>. Acesso em: 16.ju.2014.

IBGE. Indicadores IBGE. **Estatística da produção pecuária**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201304_publ_completa.pdf>. Acesso em: 10.jun. 2014.

JACOBO, R. A. et al. Identificación de serovares de *Leptospira* sp. em búfalos de Corrientes, Argentina. **Rev. Vet.**, v. 20, p. 2, p. 126-127, 2009.

JONES, T. C.; HUNT, H. D.; KING N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, 2000.

JOUGLARD, S. D. D. Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de *Leptospira* spp por sequência do 16S rDNA e análise VNTR. **Tese** (Doutorado Ciência Animal). Universidade Federal de Pelotas, 2005.

JULIANO, R. S. et al. Prevalence and epidemiology aspects of bovine leptospirosis in dairy herd from Goiânia microregion, Goiás State, Brazil. **Ciên. Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 857-862, 2000.

JUNQUEIRA, J. R. C. et al. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina: Ciên. Agra.**, v. 27, n. 3, p. 471-480, jul./set. 2006.

KOSITANONT, U.; RUGSASUK, S.; LEELAPORN, A.; PHULSUKSOMBATI, D.; TANTITANAWAT, S.; NAIGOWIT, P. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.57, p.117-122, 2007.

LABMET. **Informações climáticas**. Disponível: em <<http://www.nemrh.uema.br>>. Acesso em: 23 fev.2014.

LAGE, A. P. et al. Serology for *Leptospira* sp. In cattle of the State of Paraíba, Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 74, n. 3, p. 185-190, 2007.

LANGONI, H. et al. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 37-41, 2000.

LEITE, R. M. H.; LEITE, R. C.; BANDEIRA, D. A.; LAGE, A. P. Surto de leptospirose em rebanhos bovinos do Estado da Paraíba. **Ciênc. Vet. Trop.**, v. 3, p. 144-149, 2000.

LEVETT P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbio. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

LEVETT, P. N. et al. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, n. 3, p. 671-673, 2006.

LILENBAUM, W.; SANTOS, M. R. C. Leptospirosis in animal reproduction. The role of serovar Hardjo in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 87 – 92, 1995.

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Rev. Bras. Med. Vet.** v. 18, n. 1, p. 913, 1996.

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

LILENBAUM, W. et al. Identification of *Leptospira* spp. carries among goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 16-19, 2009.

MADRUGA, C.; AYCARDI, E.; PUTT, N. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em bovinos de corte da região sul do cerrado do Estado do Mato Grosso. **Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais**, v. 32, n. 2, p. 245-249, 1980.

MAGAJEVSKI, F. S.; GÍRIO, R. J. S.; MEIRELLES, R. B. Pesquisa de *Leptospira* em fetos de vacas abatidas no estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 67-72, abr./jun., 2007.

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S. L.; CARREIRA, R.; PERRI, S. H. V.; LUZIVOTO, M. C. Humoral immune response, bacterial recovery and time lesion in mice genetically Bolb/c mice face to *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. **Pesq. Vet. Bras.**, 23(1):5-12, 2003.

MARINHO, M. Leptospirose: fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogenicos. **Vet. Zootec.** v. 15, n. 13, dez., p. 428-434, 2008.

MARQUES, A. E. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de Goiás. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 72f. 2008.

MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; BRITO, W. M. E. D.; FIORAVANTI, M. C. S.; PARREIRA, I. M. e JAYME, V. S. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 607-617, jul/set. 2010.

MARTINS, G.; PNNA, B.; LILENBAUM, W. Differences between seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health Production**, 2012.

MATHIAS, M. A. et al. *Leptospira licerasiae* spp nov. In Listo of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly Plubished, Validation List nº 125. **Int. J. Evol. Microbiol.**, v. 59, p. 1-2, 2009.

McDOWELL, A. "Do icterus epidemicus". **Arq. Bras. Med.**, v. 7, p. 635-645, 1917.

MELO, L. S. S. A ovinocultura e a detecção de aglutininas anti-*Leptospira* em ovelhas no Núcleo Rural Taquara, Distrito Federal. 2009. 73f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Animais). Universidade de Brasília. Brasília, DF.

MENEGAS, P. H.; TONETTE, G.; OLIVIERA, L. A.; FREITAS, J. C.; GONÇALVES, D. D. Leptospirose em propriedade rural com histórico de aborto bovino da Região Centro-Sul do Estado do Paraná – Relato de caso. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 1783, 2013.

MESQUITA, M. et al. Análise de série temporal para avaliação do perfil sorológico da leptospirose bovina no estado do Rio Grande do Sul de 1996 a 2006. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 381-387, 2010.

MIASHIRO, A. F. Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul, 52f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, 2013.

MINEIRO, A. L. B. B. et al. Infecção por *Leptospira* em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 5, p. 1103-1109, 2007.

MINEIRO, A. L. B. B. Leptospirose bovina na bacia leiteira de Parnaíba, PI, Brasil, 68f. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

MOREIRA, E. C. Avaliação de métodos para erradicação de leptospirose em bovinos, 94f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

MOREIRA, E. C.; SILVA, J. A.; VIANA, F. C. Leptospirose bovina I. Aglutininas anti-*Leptospiras* em soro sanguíneo de bovinos de Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v. 31, p. 375-78, 1979.

MYBURGH, J. G., et al. Serological reactions to *Leptospira* species in buffalo (*Syncerus caffer*) from the Kruger National Park. Onderstepoort. **Aus. J. Vet. Res.**, v. 57, n. 4, p. 281- 282, 1990.

NEGRÃO, A. M. G.; MOLNAR, E.; MOLNAR, L. Leptospirose em bovinos abatidos em matadouros no Estado do Pará. **Rev. Cienc. Agrar.**, Belém, n. 33, p. 77-86, jan./jun. 2000.

OIE. **Código Sanitário para Los Animales Terrestres**. Chapter. 1.2. Criterio de inscripción de enfermedades en la lista de la OIE. p. 251-264, 2009. Disponível em: <<http://www.oie.int/eng/normes/mcodees/sommaire.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

OIE. **Leptospirosis**. 2010. Chapter 2.2.4. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00043.htm>. Acesso em: 21 fev. 2014.

OIE. **Terrestrial Manual** 2014 1. This disease is no longer listed by the OIE. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014. Leptospirosis, C H A P T E R 2.1.9. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00043.htm>. Acesso em: 21. jun. 2014.

OLIVEIRA, E. A. A. Leptospirose: prevalência, sorovares predominantes e fatores de risco em rebanhos bovinos leiteiros da Regional de Bacabal, Maranhão, Brasil. **Monografia** (Curso de Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Maranhão. Escola de Medicina Veterinária, São Luís, 2013.

OLIVEIRA, F. C. S. et al. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. **Arq. Inst. Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 539-546, 2009.

OLIVEIRA, F. C. S. Leptospirose no Estado da Bahia, Brasil: prevalência, sorovares predominantes, distribuição espacial e fatores de risco. 123f. 2008. **Dissertação** (Mestrado em Defesa Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, F. S. Incidência de leptospirose em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. **Monografia** (Curso de Graduação em Medicina Veterinária). Faculdade Plínio Leite, Niterói, RJ, 1998.

OLIVEIRA, M. S.; SILVA, P. R. Uma análise da formação econômica do território maranhense através da agropecuária: um olhar acerca da origem e desenvolvimento da pecuária no Estado. ENCONTRO NACIONAL DE GEOGRAFIA AGRÁRIA, 20., 2012. Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

OLIVEIRA, R. M. et al. Seroepidemiology of bovine leptospirosis and brucellosis in family farm rural properties in the State of Paraíba, northeastern Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 303-311, 2013.

OMS. **Leptospirosis humana**: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 2008.

PAIXÃO, M. S.; ALVES, M. F.; PIRAJÁ, G. V.; ALVES, M. L.; FERREIRA, A. G.; TENÓRIO, M. S.; BUZETTI, W. A. S.; LUCHEIS, S. B. Soroprevalência para leptospirose em animais silvestres de vida livre procedentes do centro de conservação da fauna silvestre de Ilha Solteira, SP. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 210-213, jul./dez., 2011.

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

PHILIP, S. S. Spirochetal Infections. En: McPhee SJ, Papadakis MA editors. **Current Medical Diagnosis & Treatment**. USA: Mc Graw Hill; p. 1414-1415, 2011.

PIMENTEL, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; MARVULO, M. F. V.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; SILVA, J. C. R.; NETO, J. E. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do zoológico de Aracaju, SE. **Pesq. Vet. Brasil.**, v. 29, n. 12, p. 1009-1014, 2009.

PINHEIRO, R. R.; PINHEIRO, A. A.; GOUVEIA, A. M. G. **Métodos de diagnósticos das lentivirose de pequenos ruminantes**. Sobral: Embrapa, 2001.

PIRES, A. V. **Bovinocultura de corte**. FEALQ, v. 2, cap. 51, p. 971-975, 2010.

PRITCHARD, D.G. National situation of leptospirosis in the United Kingdom. In: W.A. ELLIS and T.W.A. LITTLE (ed.): Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff, Dordrecht, **The Netherlands**, p. 221-233, 1986.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1737, 2002.

RECUERO, A. L. C. et al. **Diagnóstico laboratorial de leptospirose em bovinos: identificação de sorovares prevalentes**. Congresso de Iniciação Científica, 15; Encontro de Pós-graduação, 8, 2006. Pelotas, RS. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/cic/2007/cd/pdf/CA/CA_01339.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2013.

REZENDE, M. B. et al. Leptospirose. Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico. Ed. Cejup. Universidade do Estado do Pará. **Instituto Evandro Chagas**, 1997.

RIET-CORREA, F.; LEMOS, R. A. A. Leptospirose. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed., São Paulo: Varela, v. 1, 2001.

ROLIM, M. B. Q. et al. Determinação de anticorpos anti-*Leptospira* spp e anti-*Brucella abortus* em bovinos abatidos em matadouro público no Estado de Pernambuco. **Rev. Med. Vet.**, Recife, v.7, n.1, p.24-30, 2013.

ROQUEPLO, C.; CABRE, O.; DAVOUST, B.; KODJO, A. Epidemiological study of animal leptospirosis in New Caledonia. **Veterinary Medicine International**, Article ID 826834, 6p., 2013.

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

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das Leptospiras. **Rev. Microbiol.**, v. 1, p. 97, 1970.

SANTA ROSA, C. A. et al. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of serovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. **Intern. J. Zoonosis**. Taipei, v. 7, p. 40-43, 1980.

SANTA ROSA, C. A. et. al. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of a new serotype in pyrogenes group. **Am. J. Veter. Research**, Chicago, v. 36, p. 1363-1365, 1975.

SANTIN, A. P. I. Perfil sanitário de bovinos da raça curraleiro frente a enfermidades de importância econômica. 78f. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2008.

SANTOS, H. P. Alguns aspectos do sistema de produção e da sanidade dos bovinos de leite da Ilha de São Luís, MA. 1988. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1988.

SANTOS, J. P. et al. Aglutininas anti-Leptospíricas em gatos do município de Uberaba-MG. **Ciê. Anim. Bras.**, Goiânia, n. 1, p. 41-43, 2008.

SARMENTO, A. M. C. et al. Emprego de estirpes *Leptospira* spp isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico de leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 7, p. 601-606, 2012.

SCHOONMAN, L.; SWAI, E. S. Herd and animal-level risk factors for bovine leptospirosis in Tanga region of Tanzania. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v. 42, p. 1565-1572, 2010.

SCOLAMACCHIA, F. et al. Serological Patterns of Brucellosis, Leptospirosis and Q Fever in *Bos indicus* Cattle in Cameroon. **Plos One**, v. 5, Issue 1, 8623, Jan., 2010. Disponível: <<http://www.plosone.org>>. Acesso em: 24.nov.2013.

SEHGAL, S.C. Epidemiological patterns of leptospirosis. **Indian J. Med. Microbiol.**, New Delhi, v. 24, n. 4, p. 70-75, 2006.

SILVA, L. G. da. Incidência de leptospirose em animais e em seres humanos em região representativa do Noroeste do Estado do Rio de Janeiro. 70f. 2007. **Dissertação** (Mestrado Ciência Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, E. N. O. Ocorrência da aglutininas anti-*Leptospiras* spp. em feirantes e cães de dez feiras do município de São Luís-MA. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias, São Luís, Ma, 2008.

SILVA, F. J.; MATHIAS, L. A.; MAGAJEVSKI, F. S.; WERTHER, K.; ASSIS, N. A.; GIRIO, R. J. S. Anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais domésticos e silvestres presentes no Campus Universitário da FCAV, UNESP, JABOTICABAL/SP. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 1, p. 17-25, 2010.

SILVA, F. S. et al. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 4, p. 303-312, 2012.

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

SOTO, F. R. M. et al. Leptospirose Suína. **Arq. Inst. Biol.**, v. 74, n. 4, p. 379-395, 2007.

SOUSA, S. C. Leptospirose como doença ocupacional: avaliação em funcionários trabalhando com limpeza pública em São Luís - MA, 1994. 39f. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Maranhão, 1994.

SOUZA JÚNIOR, M.F.; LOBATO, Z. I. P.; LOBATO, F. C. F. Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins. **Rev. Socied. Brasil. Med. Tropical**, v.39, p. 292-294, 2006.

SOUZA, M. A. et al. Padronização e validação de Elisa indireto para o diagnóstico da leptospirose bovina. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 993-999, nov./dec. 2012.

SPEELMAN, P.; HARTSKEERL, R. Leptospirosis. In: FAUCI, A. S. et al. **Harrison's principles of internal medicine**. USA: Mc Graw Hill, 2008. p. 1048-1051.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Vet. J.**, Saint Leonards, v. 50, p. 216-223, 1974.

TENÓRIO, T. G. S. et al. Seroprevalence of brucellosis and leptospirosis in dairy bovine herds of Pernambuco State, Brazil. **Vet. Notícias**, Uberlândia, v. 11, n. 2, p. 43-48, 2005.

THOMPSON, J.A. et al. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Prevent. Vet. Med.**, Amsterdam, v. 76, p. 290-301, 2006.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworths, p.610, 2007

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 from Brazilian Pantanal using IgG ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Braz. Jour. Microb.**, v. 38, p. 674-680, 2007.

TOMICH, R. G. P. et al. Sorodiagnóstico de doenças da reprodução em rebanhos de bovinos leiteiros de assentamentos rurais de Corumbá, MS. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 4, p. 986-991, 2009.

TONIN, A. A. et al. Leptospirose bovina: aumento na incidência da *Leptospira interrogans* sorovar butembo no rebanho do estado de Santa Catarina, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 4, p. 294-297, 2010.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworths, p.610, 2007.

VAKILI, H.; HASSANPOUR, A.; KHAKPOUR, M. Seroprevalence of leptospirosis in dairy cows in Mianeh, Iran. **Ann. Biol. Research**, v. 4, n. 7, p. 161-164, 2013.

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. et al. 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. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 64, n. 2, p.7-15, 1997.

VASCONCELLOS, S. A. Prova de soro-aglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose: elementos fundamentais para a interpretação dos resultados. **Circular Técnico** - FMVZ-USP, São Paulo, 1997.

VASCONCELLOS, S. A. et al. Isolation of *Leptospira Santarosai* serovar Guricura from Buffloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbio.**, v. 32, p. 298-300, 2001.

VASCONCELLOS, S. A. Laboratory diagnosis of leptospirosis in animals. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE LEPTOSPIRA Y LEPTOSPIROSIS EN LAS AMÉRICAS. MÉXICO. 2004, México. **Anais...** México: Divisões education continua de La Universidade Nacional Autônoma do México, v.1, p. 70-76. 2004.

VASCONCELOS, C.G.C. Zoonoses ocupacionais: inquérito soro- epidemiológico em estudantes de medicina veterinária e análises de risco para Leptospirose, Brucelose e Toxoplasmose. 2003,108f. **Tese** (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

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

WANG, B.; SULLIVAN, J. A.; SULLIVAN, G. W. Role of specific antibody in interaction of leptospires with human monocytes and monocyte-derived macrophages. **Infect. Immun.**, 46:809-813, 1984.

WANG, Z. et al. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 39, 2007.

WANYANGU, S. W. et al. The study of the ecology and prevalence of leptospirosis in large wild ruminants and domesticated bovines found in Kenya. Israel **J. Vet. Med.**, v. 43, n. 4, p. 340-341, 1987.

WHO. **Current problems in leptospirosis research**. Report. of WHO expert Group., Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser., 380 p., 1967.

WHO. **Human leptospirosis**: Guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003.

YANAGAWA, R.; KAWASSIMA, H.; HIROTA, E. Studies on the bovine leptospirosis in Japan. I. Epizootiological investigations. **Expl. Rep. Govt. Exp. Stn. Anim. Hyg.**, v. 29, p. 261-275, 1955.

YANAGUITA, R. M. Contribuição ao estudo das leptospiroses bovina. Isolamento de dois novos sorotipos no sorogrupo Hebdomadis: sorotipos *Guaicurus* e *Goiano*, 1972. 71f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1972.

YASUDA, H. P. S. G. A. S. K. R. Deoxyribonucleic acid relatdness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira interrogans*. **Inter. J. Systematic Bacteriology**, v. 37, p.407-415, 1987.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: *LEPTOSPIRA* spp EM REBANHOS BOVINOS DAS BACIAS LEITEIRAS DAS REGIÕES CENTRAL E NORDESTE DO ESTADO DO MARANHÃO-BRASIL: frequência, fatores de risco e mapeamento de focos

ORIENTADOR: Prof. DSc. Hamilton Pereira Santos

PESQUISADORA: Adriana Prazeres Paixão

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual do Maranhão/UEMA

As informações prestadas serão sobre o manejo de criação, sanitário, reprodutivo e alimentar, além de observações que poderão estar associadas à infecção de Leptospirose Bovina em rebanhos leiteiros da região. Vale ressaltar que esta pesquisa não acarretará em custos ao criador e que a sua identidade será preservada. Comprometo-me ainda, quanto ao retorno referente aos resultados obtidos laboratorialmente.

Criador: declaro ter sido informado e concordo em participar ao responder o questionário sobre Leptospirose Bovina, parte integrante do projeto de pesquisa acima citado.

Proprietário e/ou responsável
CPF

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE COLETA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

LEPTOSPIROSE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS

UNIDADE REGIONAL:

MUNICÍPIO:

PROPRIETÁRIO:

PROPRIEDADE:

DATA DA COLETA:

SEQUÊNCIA DAS AMOSTRAS:

ITEM	Nº SEQUÊNCIA	NOME DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA	PEAGEM

APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

LEPTOSPIRA spp EM REBANHOS BOVINOS DAS BACIAS LEITEIRAS DAS REGIÕES CENTRAL E NORDESTE DO ESTADO DO MARANHÃO-BRASIL: frequência, fatores de risco e mapeamento de focos

Propriedade: _____ Data: _____
 Endereço: _____
 Proprietário: _____ Telefone: _____
 Município: _____ UF: _____
 UR: _____
 Área total / ha: _____
 Área destinada ao pastejo e/ou capineiras: _____
 Coordenadas:
 Lat |__| |__| ° |__| |__| ' |__| |__| . |__| |__|"
 Lon |__| |__| ° |__| |__| ' |__| |__| . |__| |__|"

➤ Estratificação animal

Até 12 m		a 24 m		25 a 36 m		> 36 m		TOTAL	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F

➤ Outras espécies

Bubalinos	Caprinos	Ovinos	Equinos	Asininos	Suínos	Aves	Caninos	Felinos

➤ **MANEJO DE CRIAÇÃO**

- 1- Tipo de criação? () extensivo () semi-intensivo () intensivo
- 2- Adquire animais com frequência? () sim () não
- 3- Realiza quarentena? () sim () não

➤ **MANEJO REPRODUTIVO**

- 4- Qual época do ano que ocorre o maior número de parições? () seca () chuvas
- 5- As vacas apresentaram histórico de aborto nos últimos 12 meses? () sim () não
- 6- O que faz com o animal que abortou? () separa envia para abate () não separa e deixa no plantel () vende outra finalidade
- 7- Realiza inseminação artificial? () sim () não
- 8- Piquete para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto? () sim () não
- 9- O que faz com o feto abortado e a placenta? () enterra/joga em fossa/queima () alimenta porco/cão () não faz nada
- 10- Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução? () sim () não

➤ **MANEJO ALIMENTAR**

- 11- Há presença de roedores ou outras espécies que circulam no ambiente de alimentação ou no armazenamento de rações? () sim () não
- 12- Na propriedade há áreas alagadiças às quais o gado tem acesso? () sim () não
- 13- Aluga pastos em alguma época do ano? () sim () não
- 14- Principal fonte de água dos animais? () açudes () poços () rios () igarapés

➤ **MANEJO SANITÁRIO**

- 15- Possui assistência veterinária? () sim () não
- 16- Realiza vacinação contra leptospirose? () sim ()

ASSINATURA DO CRIADOR/RESPONSÁVEL

ADRIANA PRAZERES PAIXÃO
MÉDICA VETERINÁRIA/CRMV-MA 0725
(Mestranda MPDSA/Mat 12DSA01)

ANEXOS

ANEXO A - Mapa das Unidades Regionais da Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão/AGED-MA

