

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DIAGNOSTICO DE Leptospira SPP.UTILIZANDO AS TECNICAS DE
SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCOPICA E IMUNOHISTOQUIMICA**

Erico Lawrence Milen Coelho

São Luís – MA
2011

Erico Lawrence Milen Coelho

**DIAGNOSTICO DE Leptospira SPP.UTILIZANDO AS TECNICAS DE
SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCOPICA E IMUNOHISTOQUIMICA**

Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação da universidade estadual
do maranhão como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal

Área de Concentração: Medicina Veterinária
Preventiva

Orientadora: Prof^a. DSc. Ana Lúcia Abreu Silva

Co-orientadora: DSc. Solange de Araújo Melo

São Luís – MA

2011

Coelho, Erico Lawrence Milen
Diagnostico de leptospira spp.utilizando as tecnicas de
soroaglutinação microscopica e imunohistoquimica/ Erico
Lawrence Milen Coelho-São luis,2011

55f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Medicina Veterinária,
Universidade Estadual do Maranhão, 2011.

Orientador: Prof^a.Dr. Ana Lúcia Abreu Silva

1.Anticorpos 2.Hadjo 3.Leptospirose I.Titulo

CDU:636.2.616.98(812.1)

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 22/06/2011 pela banca
Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. DSc. Fabio Henrique Evangelista de Andrade

1º Membro

Prof^a. DSc. Débora Martins Silva Santos

2º Membro

Prof^a. DSc. Ana Lúcia Abreu Silva

Orientador

*Aos meus amados pais, Sebastiao Gomes Coelho Neto e Olinda Milen Coelho
pela proteção, aconchego e dedicação, além do amor e respeito às pessoas e animais que
me foi ensinado. Aos meus irmãos pela paciência, compreensão e apoio nas horas difíceis.
In memoriam ao meu irmão Ethan Lawrence Milen Coelho!*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida e por todas as coisas boas na minha vida;

Agradeço a Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pela oportunidade que me foi dada na realização desta Pós-Graduação;

Quero agradecer a todas as pessoas que de alguma forma ajudaram a construir esta dissertação, em especial: a Prof.^a Dr.^a Ana Lucia de Abreu Silva pela orientação e paciência nestes dois anos de convivência;

À FAPEMA pela bolsa e pelos recursos que me ajudaram na realização deste trabalho;

Aos meus amigos do Laboratório de Anatomopatologia, Gabriel Xavier, Renata Mondego e Venir Débora pela ajuda imprescindível na coleta das amostras;

Aos meus amigos da turma do mestrado Joyce Cortês de Sá, Andréia Pereira, Lucélia Cunha, Manoel Moura e Ylisieé;

Ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas FMVZ-USP em especial ao professor Silvio Arruda Vasconcelos e as técnicas Zenaide e Gisele;

*As minhas amigas **Nancyleni Pinto Chaves e Solange de Araújo Melo pelo apoio na hora de escrever a dissertação;***

E a todas as pessoas, que embora anônimas, participaram de alguma forma na construção desta dissertação, seja direta ou indiretamente. Tenham certeza de que foram muito importantes para mim e que jamais serão esquecidas

Muito Obrigado!!!!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará o seu tamanho original”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
	Lista de tabela.....	09
	Lista de abreviatura e símbolos.....	10
2	OBJETIVOS.....	17
	2.1 Geral.....	17
	2.2 Específicos.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
	3.1 Histórico.....	18
	3.2 Etiologia.....	19
	3.3 Epidemiologia.....	20
	3.4 Patogenia.....	24
	3.5 Situação da Leptospirose.....	25
	3.5.1 Situação da Leptospirose no Mundo.....	25
	3.5.2 Situação da leptospirose no Brasil.....	26
	3.6 Diagnóstico.....	28
	3.7 Controle.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
	4.1 Local de Estudo.....	32
	4.2 Delineamento Amostral.....	32
	4.3 Coleta das Amostras.....	33
	4.3.1 Sangue.....	33
	4.3.2 Tecido Placentário.....	34
	4.4 Análise das Amostras.....	34
	4.4.1 Soroaglutinação Microscópica (SAM).....	34
	4.4.2 Imunohistoquímica (IHQ).....	35
	4.5 Análise Estatística.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

RESUMO

COELHO, E.L.M. **Diagnostico de leptospira spp.utilizando as tecnicas de soroaglutinação microscopica e imunohistoquimica**

. [Diagnosis of leptospira spp.utilizando the techniques of microscopic agglutination test and immunohistochemistry] 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

A Leptospirose possui distribuição mundial e é considerada uma das principais doenças de bovinos. A doença é responsável por perdas econômicas tanto na esfera produtiva como reprodutiva. Deste modo, a pesquisa foi realizada, com o objetivo de diagnosticar *Leptospira* spp. em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos no município de São Luís - MA. Amostras de soro sanguíneo e tecido placentário de 100 fêmeas bovinas não vacinadas contra leptospirose foram analisados por meio das técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Imunohistoquímica (IHQ). O estudo foi realizado em 03 matadouros-frigoríficos sob Inspeção Municipal. As amostras sanguíneas e tecido placentário foram coletados de fêmeas sem sinais clínicos de leptospirose com idade superior a 24 meses. Das 100 amostras de soros analisadas, 64% (n=64) foram positivas, com títulos iguais ou superiores a 1:200, e 36% (n=36) negativas para todos os sorovares testados. Dos 24 sorovares testados os mais freqüentes em ordem decrescente foram: Hadjo, Grippytyphosa e Wolffi. Das 100 amostras de tecido placentário analisados pela técnica de Imunohistoquímica, 40% (n=40), foram positivas. Foram consideradas reações positivas a presença de material filamentar granular ou homogêneo, com coloração marrom, distribuídos difusamente no tecido placentário, com marcação de diferentes tipos celulares. Os valores de sensibilidade e especificidade para a técnica de IHQ foram de 16% e 17%, respectivamente, com diferença estatística significativa ($P < 0.05$) entre as técnicas. O nível de concordância entre as técnicas SAM e IHQ foi inferior a 0.20, evidenciando grau desprezível de concordância. A frequência de anticorpos *anti-Leptospira* spp. em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos no município de São Luís - MA foi elevado, com a confirmação do agente etiológico em 40% das amostras. Esses achados indicam a necessidade da realização de diagnóstico sistemático e monitoramento dos rebanhos, além da implantação de medidas de controle e profilaxia, como remoção gradual de animais infectados, realização de quarentena ao ingresso de novos animais nas propriedades, realização de exames sorológicos, vacinações e implementação de boas práticas higiênicas nos matadouros-frigoríficos.

Palavras - chave: Leptospirose, anticorpos, antígenos, hadjo, bovinos.

ABSTRACT

COELHO, E.L.M . **Diagnosis of leptospira spp.utilizando the techniques of microscopic agglutination test and immunohistochemistry[Diagnostico de leptospira spp.utilizando as tecnicas de soroaglutinação microscopica e imunohistoquimica]** 60 F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIENCIAS ANIMAL)-UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

. Leptospira spp. in cattle slaughtered in slaughterhouses-in São Luís, Maranhão state: Diagnosis by Microscopic Agglutination Test techniques and Immunohistochemistry]. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

Leptospirosis has a worldwide distribution and is considered a major disease of cattle. The disease is responsible for economic losses both in the productive and reproductive. Thus, the survey was conducted in order to diagnose Leptospira spp. in cattle slaughtered in slaughterhouses-in São Luís - MA. Blood serum samples and placental tissue of 100 cows were not vaccinated against leptospirosis analyzed using the techniques of Microscopic Agglutination Test (MAT) and Immunohistochemistry (IHC). The study was conducted in 03 refrigerated slaughterhouses under Municipal Inspection. The blood samples and placental tissue were collected from females without clinical signs of leptospirosis over the age of 24 months. Of the 100 serum samples analyzed, 64% (n = 64) were positive, with titers equal or greater than 1:200, and 36% (n = 36) negative for all serotypes tested. Of the 24 serovars tested the most frequent in descending order were: Hadjo, and Grippotyphosa Wolffi. Of the 100 samples analyzed placental tissue by Immunohistochemistry technique, 40% (n = 40), were positive. Were considered positive reactions to the presence of filamentary material granular or homogeneous, with brown, diffusely distributed in the placental tissue, marked in different cell types. The sensitivity and specificity for IHC technique were 16% and 17%, respectively, which was statistically significant (P <0.05) between the techniques. The level of agreement between the SAM and IHC techniques was less than 0.20, indicating negligible degree of agreement. The frequency of anti-Leptospira spp. in cattle slaughtered in slaughterhouses-in São Luís - MA was high, with confirmation of the etiologic agent in 40% of samples. These findings indicate the necessity of systematic diagnosis and monitoring of flocks, and the implementation of control measures and prophylaxis, as gradual removal of infected animals, quarantine holding the entry of new properties in animals, serological tests, and vaccinations implementation of good hygienic practices in slaughterhouses-refrigerators.

Key words: Leptospirosis, antibodies, antigens, hadjo, Bovines.

Lista de tabelas

TABELA 01	DISTRIBUIÇÃO DO NUMERO DE AMOSTRAS SANGUINI COLETADAS POR MATADOURO-FRIGORIFICOS MUNICIPIOS DE SÃO LUÍ MA,2011.....	33
TABELA 02	Relação de sorovares utilizados na técnica de soroaglutinação microscópica (SAM).....	35
TABELA 03	resultado da técnica de soroaglutinação MICROSCOPICA de amostras sanguíneas de bovinos por matadouros- frigoríficos no município de são luis-MA 2011.....	36
TABELA 04	Sorovares de <i>Leptospira interrogans</i> encontrados em soros sanguíneos de bovinos abatidos em matadouros- frigoríficos no Município de São Luís-MA, pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), 2011	37
TABELA 05	Comparação das técnicas Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Imunohistoquímica (IHQ), para determinação da Sensibilidade (Se) e Especificidade (Es) da técnica de IHQ	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CMT – California Mastitis Test

ELISA-(Enzyme-Linked Imunoabsorbent Assay)

Es – Especificidade

GTA – Guia de Trânsito Animal

IHQ – Imunohistoquímica

K - Kappa

OIE - Organização Internacional de Epizootias

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia de polimerase

RIFI – Imunofluorescência Indireta

SAM – Soroaglutinação micorscópica

Se – Sensibilidade

Who-Word Health Organization

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho comercial do mundo, com um efetivo aproximado de 162 milhões de animais, evidenciando inquestionável aptidão nacional para a exploração pecuária. O Estado do Maranhão ocupa o segundo lugar na região Nordeste, com 6.885.265 cabeças, constituindo-se no décimo primeiro rebanho bovino no cenário nacional (IBGE, 2009). Portanto a pecuária bovina representa para o Estado do Maranhão uma atividade produtiva de caráter permanente e consolidado, com grande representatividade econômica.

A produção pecuária maranhense significativa em termos quantitativos depara-se com inúmeros entraves, a exemplo do que ocorre no país, uma vez que os valores médios de produção e produtividade situam-se em patamares desfavoráveis quando comparados aos índices de outros países (BEZERRA, 2009).

Diversos são os fatores que contribuem para este quadro, o que aponta para a necessidade premente de mudanças no manejo e práticas sanitárias que visem à maior produtividade e desempenho dos rebanhos (BEZERRA, 2009). Mudanças sanitárias bem conduzidas reduzem a introdução, manutenção e disseminação de doenças infecciosas (MARQUES, 2008).

Entre as doenças infecciosas, as enfermidades que envolvem a esfera reprodutiva, constituem condição de especial interferência no processo produtivo, aspecto que se agrava quando o agente etiológico envolvido, além de afetar um amplo espectro de espécies animais susceptíveis, atinge também a espécie humana (GIVENS, 2006). Este é o caso da leptospirose, enfermidade responsável por grandes perdas econômicas na produção de bovinos, decorrentes de abortamentos, infertilidade e nascimento de bezerros fracos.

A leptospirose é uma doença infecciosa sistêmica, aguda, febril, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (BRASIL, 2004; FIOCRUZ, 2005; OIE, 2006). Este gênero possui duas espécies: *Leptospira biflexa*, que é apatogênica, e *Leptospira interrogans*, que é patogênica e possui mais de 200 variantes sorológicos (FAINE, 1999).

A leptospirose é uma antropozoonose de distribuição cosmopolita, no entanto, a América Latina, África e Ásia evidenciam os maiores níveis de

ocorrência. As condições ambientais destas áreas como, clima tropical e subtropical, elevada temperatura em determinados períodos do ano, altos índices pluviométricos favorecem o aparecimento de surtos epidêmicos de caráter sazonal (WHO, 2003).

No Brasil, a doença é endêmica e representa sérios riscos à Saúde Pública. O país apresenta aspectos fisiográficos favoráveis à disseminação e à endemicidade da leptospirose por suas condições de temperatura e umidade próprias, e à presença de fauna silvestre, constituindo-se em potenciais reservatórios (BRASIL, 1994).

A manutenção de leptospirosas nas regiões urbanas e rurais do Brasil é favorecida além das características climáticas também por uma vasta população de roedores. O crescimento urbano desordenado e a grande quantidade de lixo espalhado sobre vias e terrenos baldios propiciam também um ambiente ideal para a proliferação da população murina.

A leptospirose é caracterizada por um amplo espectro de espécies susceptíveis. Os animais são hospedeiros primários, essenciais para a persistência dos focos de infecção por leptospirosas, e os seres humanos são hospedeiros incidentais, terminais, pouco eficientes na perpetuação da mesma (BRASIL, 1995; FAINE, 1999).

Dos animais domésticos, os bovinos são os grandes responsáveis pela manutenção e introdução da leptospirose nas propriedades, sendo considerados importantes disseminadores da doença para humanos. Os bovinos podem se infectar com quaisquer sorotipos de leptospirosas patogênicas que existam no meio ambiente (ARAÚJO et al., 2005).

Dentre os animais sinantrópicos, os roedores são os principais reservatórios da doença, os quais disseminam leptospirosas no ambiente através da urina que contamina o solo, água e alimentos destinados ao consumo humano e animal (LEVET, 2001).

As vias de eliminação relacionadas à disseminação da leptospirose animal incluem urina, sêmen, produtos do abortamento e as secreções vaginais (FAINE et al., 1999).

A transmissão pode ocorrer pelo contato direto da espiroqueta eliminada pela urina. Órgãos de portadores como, pele, mucosa oral e conjuntival também

são fontes de infecção. A via venérea, transplacentária, mamária e o hábito de limpeza da genitália, escroto e tetas entre os animais podem constituir-se em rotas importantes da infecção (BRASIL, 1995; RIET-CORREA et al., 2001; ADORNO, 2006).

Nos bovinos, é descrita as formas aguda, subaguda e crônica da leptospirose. As formas agudas e subagudas são mais observadas em animais jovens e em vacas em lactação, caracterizadas por mastite atípica de início súbito com queda na produção leiteira. A forma crônica da doença é representada por distúrbios reprodutivos, principalmente abortamentos, que ocorrem com maior frequência do 5º ao 6º mês de gestação. Os sorovares mais importantes nesta espécie são o *hardjo* e o *pomona* (SULLIVAN, 1974).

A leptospirose bovina é uma doença de notificação compulsória (OIE, 2003), entretanto, não está submetida ao combate organizado por órgãos e entidades públicas ou privadas de sanidade animal, o que dificulta conhecer a verdadeira extensão das infecções por *Leptospira spp.* nos rebanhos bovinos em qualquer região do país.

Estudos comprovam a existência da leptospirose nos rebanhos nacionais e maranhenses e indicam a necessidade de estudos que apontem a real magnitude do problema, já que os estudos estaduais são escassos e esparsamente relatados, o que se justifica pela relativa dificuldade de diagnóstico laboratorial, diversidade e manifestações clínicas e complexidade etiológica. A soroprevalência da leptospirose em rebanhos bovinos varia de 74% a 100% (HOMEM et al. 2001; FAVERO et al. 2001; THOMPSON et al. 2006; LAGE et al. 2007) e, em animais de 45,56% a 95% (LANGONI et al. 2000; FAVERO et al. 2001; CAMPOS Jr. et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2009).

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado através da identificação do agente ou pela detecção de anticorpos anti-*Leptospira spp.* (GÍRIO et al., 1990; LEVETT, 2004). O isolamento bacteriano é uma técnica de alta especificidade, entretanto, cara e laboriosa, estando disponíveis somente em laboratórios de referência (BOLIN & ALT, 1999; BOLIN, 2003).

O método sorológico de referência para o diagnóstico da leptospirose é a Soroaglutinação Microscópica (SAM), no qual se empregam suspensões de sorovares de *Leptospira spp.* É também a prova mais utilizada em inquéritos soro-

epidemiológicos uma vez que, esta evidencia os sorogrupos presentes em uma população (LEVETT, 2001).

Outras técnicas empregadas no diagnóstico são: teste imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência direta, reação em cadeia de polimerase (PCR), histopatologia e imunoistoquímica (IHQ) (LILEBAUM, 1996; BOLIN & ALT, 1999; BOLIN, 2003).

As principais recomendações para o controle da leptospirose bovina incluem investigação dos sorovares prevalente na propriedade, detecção da fonte de infecção, antibioticoterapia nos animais portadores e enfermos e imunoprofilaxia dos animais susceptíveis. De igual importância são o controle sanitário dos animais que serão incorporados ao rebanho, saneamento do ambiente favorável à sobrevivência das leptospiros e controle de roedores domésticos (LANGENEGGER, 1990; LILEBAUM, 1996).

Diante da importância que a sanidade assume na produção animal e Saúde Pública, somada à importância da pecuária bovina na economia maranhense, torna-se necessário fomentar o desenvolvimento de pesquisas na área, para que o crescimento quantitativo do rebanho seja acompanhado de perto pela elevação de seus índices de qualidade sanitária. Com base nestes aspectos é que se realizou a presente pesquisa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Dentre as zoonoses que apresentam especial interesse, seja epidemiológico em patologia humana ou ainda veterinária, destaca-se a leptospirose, enfermidade que vem causando, além de danos à saúde, enormes prejuízos econômicos. A leptospirose mostra-se cada vez mais, como uma antropozoonose responsável por problemas de Saúde Pública, devido aos prejuízos decorrentes de sua alta letalidade, ocorrendo de forma isolada ou em surtos epidêmicos sazonais (BRASIL, 1995).

A leptospirose é uma doença infecto contagiosa com uma série de manifestações clínico-patológicas que variam desde infecções inaparentes até uma enfermidade altamente fatal. Atualmente, a leptospirose é reconhecida como sendo responsável por perdas econômicas importantes em rebanhos de corte e leite em todo o mundo (BRASIL, 2004; FIOCRUZ, 2005; OIE, 2006).

3.1 Histórico

A leptospirose foi descrita pela primeira vez em 1880 no Cairo, por Larrey, e posteriormente, em 1883, por Landouzy; porém foi Weil em 1886, quem a descreveu minuciosamente como uma doença caracterizada por febre, icterícia, hemorragias e comprometimento hepático e renal, mais tarde designado por Goldschmidt como “Doença de Weil” (NARBONA et al., 2007). Outras síndromes aparentemente idênticas foram relatadas anteriormente em diversos países relacionando-as com riscos ocupacionais, porém sem a identificação de um agente etiológico (LEVETT, 2001).

O agente infeccioso só foi observado 21 anos depois, por Stimson, e em 1915 foram cultivados por Inada (REZENDE et al., 1997). Segundo Gomes et al. (2007), em 1915 os pesquisadores Uhlenhuth & Fromme comprovaram a existência do agente etiológico, e inocularam sangue de soldados alemães com suspeita de infecção em cobaias. Posteriormente, os animais inoculados morreram e as bactérias foram vistas no microscópio e identificadas, sendo denominadas de “*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*”.

Dois anos depois, o bacteriologista Hideyo Noguchi identificou a bactéria, denominando-a de *Leptospira* (ALONSO et al., 2000).

3.2 Etiologia

Leptospirose é a denominação genérica de um grupo de enfermidades infecto-contagiosas de caráter agudo, clinicamente polimórficas, causadas pela *Leptospira interrogans*. As leptospiras são bactérias pertencentes à classe Eubacteriales, ordem Spirochaetales, família Leptospiracea e gênero *Leptospira*. A classificação etiológica das leptospiras apresenta duas divisões; a primeira é genética e a segunda baseada nos determinantes antigênicos (LEVETT, 2001).

O gênero *Leptospira* compreende duas espécies: *L. interrogans* e *L. biflexa*; ambas congregam grande número de variantes, denominados sorovares, que constitui a unidade taxonômica básica. Enquanto que a primeira espécie engloba sorovares patogênicos para o homem e animais, a segunda representa as leptospirosas de vida livre, que têm como habitat natural as águas e o solo úmido (BRASIL, 1994-1995; FAINE, 1999).

Para fins práticos, os sorovares que apresentam maiores afinidades sorológicas são agrupados em sorogrupos. Atualmente, as leptospirosas patogênicas estão divididas em oito espécies, distribuídas em mais 200 sorovariedades e arranjadas em 23 sorogrupos (FAINE, 1999).

O grupo das espécies patogênicas contém oito subdivisões: *Leptospira interrogans* “*sensu stricto*”, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirshneri* e *L. faineii*. O grupo das espécies saprófitas possui cinco espécies distintas: *Leptospira biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *Turneria parva* e *Leptonema illini* (LEVETT, 2001).

Microbiologicamente, as leptospirosas são bactérias móveis, não capsuladas nem esporuladas, aeróbias obrigatórias, que reproduzem-se por fissão transversa e apresentam movimentos de saca-rolhas (spin) e de flexão-extensão, todos associados dando-lhes rápida mobilidade (SLACK et al., 2006; SANTOS, 2008).

São microrganismos espiralados, muito finos (0,1 μm), de comprimento variando de (6-20 μm), quase sempre tendo uma ou ambas as extremidades curvadas ou em forma de gancho. Devido ao seu fino diâmetro são melhores visualizadas, a fresco, em microscopia de campo escuro ou em preparação impregnada pela prata e em microscopia comum (SANTOS, 2008).

3.3 Epidemiologia

Os aspectos epidemiológicos básicos da leptospirose já se encontram bem estabelecidos, sendo clara a sua associação com os fatores climáticos, incluindo índice pluviométrico, temperatura, ventos e umidade relativa do ar. Aglomerações de animais em exposições e leilões são fatores também condicionantes à ocorrência da doença (WHO, 2003).

A distribuição geográfica da leptospirose é cosmopolita, no entanto sua ocorrência é favorecida pelos fatores climáticos. Ecologicamente, a existência e a dispersão da leptospirose são mais favorecidas nas regiões tropicais e subtropicais. As inundações, observadas após intensas chuvas, também são particularmente propícias à disseminação e persistência de leptospiras no ambiente, pois nessa situação, não ocorre evaporação ou absorção pelo solo da urina proveniente dos animais infectados (BRASIL, 1995).

As fontes de infecção na leptospirose são bastantes variadas, representadas principalmente por água, lixo e lama contaminadas com leptospiras pela urina ou tecidos de animais infectados (BRASIL, 1994).

A água tem papel importante na transmissão da leptospirose, visto que em todos os locais onde a leptospirose é endêmica, um elo hídrico se intercala entre o animal e o homem. Os alimentos também podem constituir-se em fonte de infecção, desde que, contaminados com urina de animais infectados. Nos animais em lactação, as leptospiras podem ser encontradas no leite, durante a fase sistêmica aguda da doença (RIET-CORREA et al., 2001).

Diversos fatores ambientais determinam o tempo de sobrevivência das leptospiras patogênicas; os mais importantes são o pH da urina do hospedeiro, pH do solo ou da água no qual é excretada a urina e a temperatura local. A multiplicação das leptospiras é ótima em pH compreendido entre 7,2 a 7,4. Os carnívoros têm normalmente urina com pH ácido e não são transmissores efetivos de leptospiras, ao passo que, os herbívoros têm urina neutra ou ligeiramente alcalina que prolonga a sobrevivência das espiroquetas, contribuindo significativamente para a transmissão da enfermidade (RIET-CORREA et al., 2001).

A leptospirose acomete, praticamente, todos os animais domésticos, silvestres e o homem, provocando ou não a manifestação de sinais clínicos. Várias espécies de animais domésticos e a maioria das espécies silvestres podem tornar-se portadores contribuindo para a disseminação do microrganismo na natureza (WEBSTER et al., 1995).

Roedores, pequenos carnívoros e animais domésticos são reservatórios conhecidos da enfermidade. Animais sinantrópicos, principalmente os roedores (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*) são considerados portadores

sadios universais, uma vez que, apresentam leptospirúria prolongada e raramente lesões, contaminando a água, solo e alimentos, atuando como fonte imediata de infecção (BRASIL, 2005; SEHGAL, 2006).

Na leptospirose, os animais domésticos são hospedeiros primários, essenciais para persistência dos focos da infecção, e os seres humanos são hospedeiros acidentais, terminais, pouco eficientes na perpetuação da mesma. Estes fatos ressaltam a importância do direcionamento das ações preventivas para animais vertebrados, que se comportam como reservatório da bactéria. No entanto, no relativo à saúde animal, as consequências dessa infecção são particularmente de esfera econômicas, tendo em vista, o envolvimento de bovinos, equinos, suínos, caprinos, ovinos e espécie de animais produtoras de alimentos (SANTIN et al., 2006).

Diversos sorovares da bactéria causadora da leptospirose já foram identificados em suínos, bovinos, equinos, caninos e em animais selvagens (SAMBASIVA et al., 2004; SANTIN et al., 2006). Cada sorovar tem uma espécie mamífera como hospedeiro primário. Uma única espécie animal, entretanto, pode ser o hospedeiro primário de vários sorovares e pode, em realidade, ser simultaneamente infectada por eles, bem como pode eliminar dois ou mais sorovares de leptospiras (KRIEG, 1986).

Em bovinos, esta doença é principalmente causada pelos sorovares hardjo e pomona e ocasionalmente pelos gryppothyphosa, icterohaemorrhagiae e canicola. A infecção com a variante sorológica hardjo, em bovinos, induz abortamentos, natimortalidade, nascimento de bezerras fracas, mastite e diminuição da produção de leite (BOLIN et al., 1991), além de infertilidade, anorexia, pirexia, apatia, icterícia, anemia hemolítica, hemoglobinúria, mastite e até morte, dependendo do sorotipo envolvido e da idade do indivíduo acometido (MILNER et al, 1980).

Os bovinos com infecção crônica atuam como fontes de infecção para outros animais e também para os seres humanos, nestes casos, os sorovares associados à infecção são os produtores de hemolisina como o pomona, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae e autumnalis, porém o sorovar hardjo determina infecção subclínica, com efeitos negativos no desempenho reprodutivo nos rebanhos bovinos (FAVERO, 2002; ANZAI, 2002).

Segundo Ellis (1984), a presença de leptospiros no trato reprodutivo de fêmeas bovinas pode resultar em infecção fetal e transtornos persistentes à reprodução e, a fêmea pode necessitar de 3 a 6 coberturas para voltar conceber. Na maioria dos casos, os abortamentos ocorrem no terço final da gestação, podendo haver a eliminação de leptospiros pelas descargas uterinas e persistência da bactéria nas tubas uterinas, por até 97 a 142 dias (THIERMANN, 1984).

Observações feitas por Sullivan (1974) mostram que em bovinos a infecção é marcada por depressão e ataxia. O leite secretado pode apresentar aumento no número de leucócitos, com reação positiva ao *Califórnia Mastitis Test* (CMT). Ao exame clínico não são observadas anormalidades no úbere, entretanto, alguns animais podem apresentar úbere com consistência mais flácida que o normal, com secreção de leite com aparência de colostro, presença de pequenos coágulos e, ocasionalmente, sangue (HANSON, 1977).

O sorovar pomona é a causa principal de leptospirose em suínos e equídeos. Já o cão se infecta principalmente pelos sorovares icterohaemorrhagiae e canicola, o mesmo acontecendo com os roedores. Os principais sorovares incriminados com a infecção no homem são pomona, canicola, icterohaemorrhagiae e gryppothyphosa (SAMBASIVA et al., 2004; SANTIN et al., 2006).

A leptospirose é transmitida de animal a animal e de animal ao homem, a transmissão homem a homem, porém, é pouco frequente e não tem importância prática. A transmissão ao homem ocorre diretamente por contato com urina, sangue, tecido ou órgãos de animais infectados ou indiretamente, através do contato com água e/ou solo úmido e vegetação contaminada com urina de animais doentes. A transmissão acidental em laboratórios e a ingestão de alimentos contaminados são também descritos. A forma mais frequente de transmissão humana consiste na exposição à urina de animais infectados, direta ou indiretamente (BRASIL, 1995; RIET-CORREA et al., 2001; ADORNO, 2006).

Na espécie humana, a Leptospirose tem sido notificada no Brasil desde 1917, a partir daí muitos são os estudos dedicados à investigação em diferentes regiões do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

De longa data, a leptospirose tem sido associada com a ocupação do paciente, atribuindo-se à enfermidade o caráter de doença profissional de agricultores, tratadores de animais, plantadores de arroz, cortadores de cana-de-

açúcar, limpadores de esgotos, magarefes, mineiros e outros. Investigações epidemiológicas têm constatado a nítida predominância dessa zoonose em profissões com baixo nível de remuneração. Assim, formam parte do grupo de risco, principalmente pessoas que por condições precárias de habitação e saneamento básico dos locais onde moram e trabalham, estão expostos ao contato com água e lama contaminadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

Bezerra et al., (2010) diagnosticaram aglutininas anti-leptospiras em 38,34% das 60 amostras sanguíneas de condutores de tração animal na cidade de São Luís-MA, analisadas por meio da técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e soropositividade, com reação a doze sorovares. Os sorovares mais frequentes foram copenhageni, pyrogenes, icterohaemorrhagiae e autumnalis.

A infecção humana determina manifestações muito variáveis, desde quadro subclínico ou de doença febril, caracterizada por febre, cefaléia, dores musculares, anorexia náuseas e vômitos, de início súbito que dura de um a vários dias, sendo freqüentemente rotulado de “síndrome gripal” ou “virose”, até quadros clínicos icterícos graves, com alto percentual de letalidade (AROKIANATHAN et al., 2005).

A forma severa da enfermidade manifesta-se clinicamente no homem por febre, mialgias, icterícia, hiperemia conjuntival, epistaxe, hepatomegalia, rigidez da nuca, prostração entre outros menos frequentes, com algumas variações relacionadas com os períodos septicêmico e toxêmico da enfermidade. A leptospirose pode ser confundida com outras doenças, meningite asséptica, hepatite infecciosa, febre de origem desconhecida, influenza e poliomielite (AROKIANATHAN et al., 2005).

3.4 Patogenia

O microrganismo penetra através da pele lesada ou de mucosas íntegras, como a orofaríngea, ocular, genital e pulmonar, esta última, quando ocorre inalação de aerossóis contendo microrganismos. Também pode penetrar pela pele íntegra que tenha ficado imersa em água por longo tempo. A leptospira é eliminada para o meio ambiente através da urina de animais infectados (BRASIL, 1995).

O período de incubação é de sete a 14 dias, podendo variar de um a 20 dias, e o período de transmissibilidade dura, teoricamente, enquanto a leptospira estiver

presente na urina (leptospirose), geralmente da segunda a quinta semana da doença. De acordo com Bolin (2003), os anticorpos aglutinantes são detectados nesta fase. Os animais convalescentes podem eliminar o agente através da urina durante meses ou até anos (BRASIL, 1995).

A eliminação da leptospira pela urina dos portadores ocorre por períodos de tempo que podem variar entre os animais domésticos, e por toda vida no caso dos roedores (WEBSTER et al., 1995).

3.5 Situação da Leptospirose

3.5.1 Situação da leptospirose no mundo

No continente Africano, Wanyangu et al. (1987), encontraram no Quênia búfalos selvagens reagentes aos sorovares Icterohemorrhagiae e canicola. Na África do Sul, Myburgh et al., (1990) encontraram animais reagentes aos sorovares tarassovi e hardjo na mesma espécie.

Em 1996, Chaudhry et al., verificaram que búfalos do sul da Ásia, mas precisamente na área rural do Paquistão foram reagentes aos sorovares icterohaemorrhagiae e mini. Na Oceania, Pavlov (1991), encontrou na região Norte da Austrália suínos reagentes ao sorovar pomona. Mason et al. (1998) observaram que muitos dos suínos abatidos na região Sul apresentaram elevados títulos sorológicos para leptospira, predominantemente contra o sorovar pomona.

Na América do Norte, os trabalhos de Ingebrigtsen (1986) e Goyal (1992) demonstraram que, além de animais domésticos, a leptospirose tem acometido espécies silvestres. Nos Estados Unidos, New et al. (1993), atestaram no Estado de Minnesota a presença de soros de cervos-do-rabo-branco (*Odocoileus virginianus*) reagentes aos sorovares bratislava e pomona. No Estado do Tennessee, foram encontrados soros reagentes aos sorovares hardjo, pomona e icterohaemorrhagiae (NEW et al., 1993).

O sorovar Hadjo tem sido incriminado como causador mais frequente de infecções entre rebanhos do mundo todo (VASCONCELOS et al., 1997a; FAVERO et al., 2001). Reações positivas para este sorovar já foram descritas em bovinos de diversos países, como Canadá, Estados Unidos, Espanha, México, Austrália, Argentina e África (FERESU, 1988; PRESCOTT et al., 1988; STANCHI, 1989;

KING, 1991; MILLER et al., 1991; ALONSO-ANDICOBERRY et al., 2001; CERVANTES et al., 2002).

3.5.2 Situação da leptospirose no Brasil

No Brasil, há numerosos trabalhos que tratam sobre sorologia e isolamento de leptospirose nos animais domésticos, em espécies silvestres e no homem. Uma revisão realizada no período de 1917 a 1971, sobre leptospirose nos campos da medicina humana e veterinária evidenciaram que os sorovares mais comuns em nosso país são: pomona, icterohaemorrhagiae, canicola, tarassovi, gryppothyphosa, hardjo e sejroe (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

A leptospirose foi alvo de estudos realizados por Langoni et al. (2000) em muitas espécies de animais domésticos e silvestres. Dentre os reservatórios conhecidos desta enfermidade, destacam-se animais domésticos como caninos, bovinos, suínos, caprinos, ovinos e equinos e, em meio urbano, principalmente o rato (*Rattus norvegicus*).

Em relação aos animais silvestres, embora muitos trabalhos sobre a leptospirose tenham sido realizados nas Américas, no Brasil, a enfermidade ainda é pouco estudada, deixando uma lacuna no estudo da leptospirose, o que dificulta a elaboração de planos estratégicos de controle dessa doença em regiões com grande densidade de animais, matas e rios.

Na América do Sul, Vasconcellos et al. (1997b), examinaram soros bovinos de diversos estados e verificaram que no Estado do Mato Grosso do Sul houve uma predominância de amostras reagentes ao sorovar hardjo.

De acordo com o levantamento realizado por Mathias et al. (1999) em veados-campeiros no Pantanal Mato-Grossense, foi demonstrado percentual de 24% de amostras reagentes para os sorovares hardjo, wolffi ou mini.

Um levantamento epidemiológico realizado em bovinos por Santa Rosa et al. (1969/70) em soros de bovinos oriundos dos Estados de São Paulo, Paraná, Pernambuco, Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Amapá, Pará e Rio de Janeiro constataram a presença do sorovar wolffi nos exames sorológicos, valendo destacar que o sorovar hardjo não foi incluída na pesquisa.

Em 1979, Moreira et al., verificaram a presença do sorovar wolffi no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina e, dois anos depois, um novo levantamento epidemiológico foi realizado no Estado de Minas Gerais pelos mesmos pesquisadores onde foi constatada a predominância da variante sorológica wolffi seguida de hardjo, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae e canicola. Ressalta-se que este foi o primeiro registro de bovinos reatores para a variante sorológica hardjo no Brasil; saliente-se, contudo que nesta ocasião a frequência de reagentes para a variante sorológica wolffi foi superior à observada para hardjo.

Giorgi et al. (1981), analisando soros bovinos coletados no período de 1974 a 1980, oriundos dos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Pará, encontraram animais reatores para pelo menos uma variante sorológica e as mais freqüente foram wolffi, pomona e tarassovi e a variante hardjo não foi incluída na coleção de antígenos empregada.

Em 1995, Lilenbaum et al., verificaram o predomínio da variante sorológica hardjo seguida de wolffi e bratislava em vacas com problemas reprodutivos e não vacinadas contra leptospirose no Estado do Rio de Janeiro; concomitantemente, no mesmo ano, Caldas et al. (1995), em Salvador/BA, verificaram maior frequência das variantes sorológicas wolffi, icterohaemorrhagiae e autumnalis.

Vasconcellos et al. (1997b), constataram o predomínio de reações sorológicas para a variante sorológica hardjo em rebanhos bovinos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Girio et al. (1998) verificaram, na região do Pantanal o predomínio das variantes sorológicas wolffi, grippotyphosa e pomona em bois baguás (*Bos taurus indicus*), e pomona, hardjo e wolffi em búfalos (*Bubalus bubalis*).

Ribeiro et al., em 1999, pesquisaram a presença de aglutininas para *Leptospira interrogans* em bovinos no Mato Grosso do Sul e encontraram positividade para pelo menos uma das 14 variantes sorológicas testadas com

predominância das variantes sorológicas wolffi e hardjo . Melo (1999), em São Paulo, examinou rebanhos produtores de leite tipo C e encontrou animais positivos para pelo menos uma variante sorológica, com predomínio dos mesmos sorovares encontrados por Ribeiro no Mato Grosso do Sul, fato confirmado no ano seguinte por Langoni et al. (2000), apesar de encontrarem positividade também para os sorovares pyrogenes, canicola, Bratislava, pomona, grippyphosa, castellonis; icterohaemorrhagiae, copenhageni, tarassovi e djasiman.

Anos depois, foi realizado um estudo retrospectivo dos exames sorológicos de leptospirose realizados no período de 1984 a 1997 pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, onde foi constatada a predominância de reações com as variantes sorológicas hardjo e wolffi em soros bovinos provenientes dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Bahia, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Piauí, Ceará, Maranhão, Pará, Rondônia, e do Distrito Federal. Neste estudo foram consideradas sororreagentes as variantes sorológicas que apresentaram maiores títulos no teste de soroaglutinação microscópica, e aqueles animais que apresentaram títulos mais elevados concomitantemente para dois ou mais sorovares foram desconsiderados (FAVERO, 2000).

3.6 Diagnóstico

Deve-se suspeitar da infecção por *Leptospira* spp., sempre que houver perdas embrionárias, abortamentos, malformações fetais, nascimento de animais fracos, morte perinatal. O estabelecimento do diagnóstico da leptospirose depende da avaliação de fatores relacionados ao quadro clínico, dados epidemiológicos e resultados laboratoriais.

Existem várias técnicas de diagnóstico úteis na detecção da enfermidade que podem ser divididas em dois grandes grupos: o método direto e o método indireto. O primeiro se baseia na detecção da bactéria e o segundo determina a resposta imune do tipo humoral do hospedeiro frente à ação do agente etiológico (BOLIN & ALT, 1999; BOLIN, 2003). O procedimento laboratorial a ser seguido

dependerá da fase da doença e da disponibilidade do laboratório e pessoal capacitado (MINISTERIO DA SAÚDE, 1995; AROKIANATHAN et al., 2005).

Os materiais de eleição para o diagnóstico de leptospirose são: sangue, soro sanguíneo, urina, liquor, órgãos (rins, fígado), fetos e envoltórios fetais (placenta e placentomas), além de órgãos ou tecidos com lesões macroscópicas (GIORGI et al., 1981; BOLIN et al., 1989a; BOLIN et al., 1989b; BOLIN et al., 1991).

O isolamento bacteriano é uma técnica de alta especificidade, entretanto, cara e laboriosa, estando disponíveis somente em laboratórios de referência (BOLIN & ALT, 1999; BOLIN, 2003). Considerando as dificuldades circunstanciais encontradas para isolamento do agente etiológico de casos clínicos de leptospirose, as reações sorológicas funcionam como principal prova específica de diagnóstico (MINISTERIO DA SAÚDE, 1995).

Na leptospirose, os anticorpos circulantes, em que predomina inicialmente a classe IgM e depois IgG, podem ser pesquisados por várias provas sorológicas. Entre outras, pode-se citar a fixação de complemento, hemaglutinação passiva e hemólise de eritrócitos sensibilizados. Essas provas, utilizam antígeno gênero – específico e funcionam melhor para detecção de anticorpos na fase aguda da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

O teste imunoenzimático (ELISA) tem como maior vantagem a possibilidade de detectar especificamente anticorpos de classe IgM ou IgG, o que permite esclarecer há quanto tempo ocorreu a infecção, entretanto, apresenta dificuldades de realização, em especial quanto ao equipamento utilizado (LILENBAUM, 1996).

A Imunofluorescência Direta pode ser usada para identificar leptospiras em tecidos, sangue, urina ou sedimentos, mas o conjugado de anticorpos fluorescentes atualmente em uso não é sorovar-específico. Elas tendem a negatividade a partir da convalescença (BRASIL, 1995; BOLIN, 2003).

Existem também, as provas de Macro Aglutinação, com antígenos inativados pelo formol, e a prova de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Da mesma forma, as duas últimas funcionam melhor na fase aguda da doença. A microscopia de campo escuro tem sido utilizada como teste populacional, por ser uma técnica rápida na identificação de leptospiras na urina. Tem como vantagem a velocidade, mas apresenta a desvantagem de baixas especificidade e sensibilidade (LEVETT, 2001).

A PCR pode ser usado para detectar DNA das leptospiros em amostras clínicas, sendo que em geral, o teste da urina é mais confiável que o de amostras teciduais. Este teste é capaz de detectar a presença de leptospiros, mas não o sorovar infectante (BOLIN, 2003). A imunohistoquímica também pode ser realizada para diagnóstico de leptospirose nos órgãos, visando correlacionar as lesões com a presença da bactéria nos tecidos (SILVA et al. 2006).

Segundo Lilenbaum (1996) e Vasconcellos (1997a), a reação sorológica padrão para diagnóstico da leptospirose é a de Soroaglutinação Microscópica (SAM) com antígenos vivos, a qual é recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A SAM é o procedimento laboratorial mais amplamente empregado para o diagnóstico etiológico da infecção animal. Outros métodos são dispendiosos, apresentando um resultado demorado, aplicando-se apenas a casos individuais e ou animais de alto valor estimativo ou econômico (BRASIL, 1995).

3.7 Controle

A escolha das estratégias mais adequadas para controle e profilaxia da leptospirose depende basicamente das condições específicas de cada rebanho. Em geral, essas estratégias consistem na prevenção da entrada de animais portadores, detecção e eliminação destes das propriedades, além da utilização de vacinas. Entretanto, as únicas abordagens que têm sido bem sucedidas na redução do impacto decorrente da infecção por leptospiros, são aquelas onde se dá ênfase às medidas de biossegurança em geral, com ou sem o uso de vacinas.

No momento da aquisição de animais, é importante verificar a procedência destes, adquirindo animais de propriedades idôneas. Além disso, deve-se levar em consideração que o exame sorológico negativo não garante que o animal não esteja infectado, tendo em vista que pode estar no período de incubação ou, como a produção de anticorpos é intermitente, a coleta de sangue pode ter sido realizada em um período em que não seja possível sua detecção (MELO, 2009).

A vacinação desempenha um importante papel no controle da leptospirose na propriedade, podendo reduzir sensivelmente a prevalência de animais reagentes no rebanho. Atualmente estão disponíveis vacinas comerciais que, de uma forma geral, têm em sua composição os sorovares: grippotyphosa, pomona,

canicola. Estas vacinas buscam a característica de amplo espectro de atuação, utilizando-se do artifício de possivelmente induzir a produção de anticorpos que determinem reação cruzada com outros sorovares do gênero, ampliando a eficiência desta estratégia de controle (GERRITSEN et al., 1994).

A proteção específica, por meio do emprego de vacinas aplicadas aos suscetíveis, consiste na primo-vacinação dos animais de produção, suínos e bovinos, aos três ou quatro meses de idade, seguida de uma dose de reforço 30 dias após a primeira aplicação e revacinações semestrais ou anuais conforme as condições ambientais, levando em consideração que quanto maior o risco de exposição, menor deve ser o intervalo entre as revacinações. Para a Organização Internacional de Epizootias, a vacinação anual de todos os bovinos em um rebanho fechado, ou duas vacinações ao ano em rebanhos abertos, pode ser eficiente para o controle já que a imunidade vacinal deve persistir por no mínimo seis meses (OIE, 2006).

O Código Sanitário para os Animais Terrestres da Organização Internacional de Epizootias regulamenta que todos os equinos, suínos e ruminantes destinados à reprodução e que precisarão ser transportados deverão apresentar certificado onde conste a ausência de sinais clínicos para leptospirose (POSPISSIL, 2007).

A leptospirose bovina é uma doença de notificação compulsória (OIE, 2003), entretanto, não está submetida ao combate organizado por órgãos e entidades públicas ou privadas de sanidade animal, o que dificulta conhecer a verdadeira extensão das infecções por *Leptospira spp.* nos rebanhos bovinos em qualquer região do país.

No Brasil, não existe um programa específico de controle da leptospirose. Assim, o uso de vacinas vem sendo realizado indiscriminadamente, comprometendo a interpretação dos testes sorológicos, uma vez que os anticorpos vacinais não podem ser diferenciados daqueles induzidos pela infecção natural. A inexistência de um controle oficial sobre a venda e a aplicação de vacinas, favorece o uso indiscriminado. Além disso, estudos demonstram que o uso de vacinas pode dar uma falsa sensação de segurança em relação a uma determinada enfermidade, promovendo um comportamento de risco por parte dos produtores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Soroaglutinação Microscópica (SAM)

Das 100 amostras sanguíneas de bovinos abatidos no município de São Luís - MA, avaliados pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), para identificação de *Leptospira* spp., 64% (n=64) apresentaram reações positivas, com títulos iguais ou superiores a 1:200, ao passo que 36% (n=36) foram negativos para todos os sorovares testados.

Foram encontrados animais reagentes nos três estabelecimentos com valores de 53,34% (n=16), 80% (n=24) e 65% (n=26) para os matadouros-frigoríficos A, B e C, respectivamente, sem diferença estatística significativa entre eles (Tabela 3).

TABELA 3. Resultado da técnica de Soroaglutinação Microscópica de amostras sanguíneas de bovinos por matadouro-frigorífico no município de São Luís-MA, 2011

Matadouro Frigorífico	Positivos		Negativos		Total		IC 95%	Valor de P
	N	%	N	%	N	%		
A	16	53.34	14	46.66	30	100		
B	24	80.00	6	20.00	30	100	1,96	0.09
C	26	65.00	14	35.00	40	100		

Os sorovares do complexo *Leptospira interrogans* mais frequentes nas amostras avaliadas, em ordem decrescente, foram, hadjo, grippotyphosa, wolffi, australis, copenhageni e castelloni, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Sorovares de *Leptospira interrogans* encontrados em soros sanguíneos de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos no Município de São Luís-MA, pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), 2011

Sorovar	Soropositividade (%)
1 – Hadjo	18,00
2 – Grippotyphosa	14,00
3 – Wolffi	4,00
4 – Australis	1,28
5 – Copenhageni	1,28
6 – Castelloni	0,64

O sorovar hadjo tem sido incriminado como causador mais frequente de infecções entre rebanhos do mundo todo, inclusive no Brasil (VASCONCELOS et al., 1997a; FAVERO et al., 2001). Reações positivas para este sorovar já foram descritas em bovinos de diversos países, como Canadá, Estados Unidos, Espanha, México, Austrália, Argentina e África (FERESU, 1988; PRESCOTT et al., 1988; STANCHI, 1989; KING, 1991; MILLER et al., 1991; ALONSO-ANDICOBERRY et al., 2001; CERVANTES et al., 2002).

O resultado para o sorovar hadjo como o mais frequente dentre os pesquisados no estudo revela similaridade com outras pesquisas realizadas em matadouros-frigoríficos no Brasil (GIRALDI, 2003; LILENBAUM & SOUZA, 2003; FAVA et al., 2004; MAGAJEVSKI et al., 2007; MINEIRO et al., 2007; ROLIM, 2010).

A predominância de reações para o sorovar hadjo, neste estudo, reforça a teoria de que a espécie bovina é o hospedeiro preferencial para este sorovar (ELLIS, 1994; PELLEGRIN et al., 1999) e, que sua expansão pode está relacionada à fatores ambientais ligados ao manejo (FAINE, 1982), como, descarte inadequado de restos placentários, multiplicação bacteriana em áreas alagadas, dessedentação animais em áreas contaminadas e poluição. A identificação deste sorovar como mais frequente nos animais estudados, indica que estão presentes os mecanismos de transmissão direta da leptospirose, ou seja, contato bovino a bovino.

Foram encontrados títulos para este sorovar de até 1:600, em 6% (n=6) das amostras, corroborando com Kirkbride (1990), que citou que títulos para o sorovar Hadjo em geral são baixos, sendo raramente superiores a 1:800. O mesmo autor destacou que quando a sovariedade hardjo for mais frequente, mesmo títulos baixos podem está relacionados a problemas reprodutivos e indicação de infecção. Segundo Juliano (1999), a ocorrência de aglutinações em sua maioria para a diluições 1:200, reforça a condição de infecção entre animais.

Neste estudo, embora haja predominância dos sorovares hadjo, grippotyphosa e wolffi, não deve ser descartada a possibilidade de reação cruzada na reação de soroaglutinação, para os sorovares hadjo e wolffi, pois ambos pertencem ao sorogrupo Sejroe (COSTA et al., 1998). Mesmo que tenha sido comprovada por sorodiagnóstico a existência do sorovar wolffi, nas amostras analisadas, a patogenicidade deste sorovar não foi comprovada em bovinos, tendo sido experimentalmente verificada em ovinos (BATRA et al., 1991).

Segundo Araújo et al., (2005), até 2005, não foram encontradas publicações científicas e/ou técnicas com registros do isolamento do sorovar wolffi em bovinos clinicamente doentes. Tal condição reforça a consideração que a frequência encontrada para este sorovar no presente estudo pode se tratar de reação cruzada com o sorovar hardjo, o que por outro lado amplia a importância deste último para a pecuária maranhense.

A frequência encontrada para o sorovar grippotyphosa foi superior à relatada em outros inquéritos sorológicos em populações de bovinos (LANGONI et al., 2001; CAMPOS Jr. et al., 2006; AGUIAR et al., 2006, MAGAJEVSKI et al., 2007, MARQUES, 2008). A ocorrência de infecções incidentais, causadas por sorovares que não são mantidos nos bovinos, como australis, bratislava, butembo, castellanis, grippotyphosa, copenhageni, panama, pyrogenes, shermani, andamana e patoc, sugere que a transmissão da leptospirose ocorra pelo contato direto dos animais com ambientes contaminados por *L. interrogans* oriunda de outros animais domésticos e silvestres (TONIN et al., 2010).

Muitos animais silvestres, entre eles os roedores, estão perfeitamente adaptados às leptospiras e não manifestam quaisquer sinais clínicos ou lesões (ACHA & SZYFRES, 1986). Os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença, pois são portadores sadios, albergando as leptospiras

nos rins, eliminando-as vivas pela urina no meio ambiente e contaminando, assim, água, solo e alimentos (BRASIL, 1995).

Criações simultâneas de várias espécies animais domésticas numa mesma propriedade podem favorecer a ocorrência e a prevalência da leptospirose em rebanhos bovinos (LILENBAUM, 1996; TOMAZELA, 1997).

A presença de co-aglutinações foi observada em 32 (32%) das amostras. Estas envolveram 4 dos sorovares testados, apresentado 10 combinações diferentes, com maior frequência da reação tipo hardjo/wolffi com 18,27%.

As co-aglutinações podem ser explicadas, segundo Juliano (1999) e (2003), pela infecção concomitante de vários sorovares de *Leptospira* spp., ou por reações cruzadas entre sorovares de um mesmo sorogrupo. A diversidade de combinações de sorovares em reações de co-algutinação observadas no presente estudo pode ser explicada pela ocorrência do fenômeno de reação paradoxal, como afirmado por Bolin (2003), onde há a determinação de anticorpos pouco específicos.

Vale ressaltar que todos os animais utilizados no estudo foram previamente observados/examinados *in vivo* (exame *ante-mortem*), nos currais de observação e matança, por um prazo de até 24 horas, período regulamentar de descanso, jejum e dieta hídrica e, não evidenciaram quaisquer sinais clínicos sugestivos de leptospirose, como icterícia, diminuição da ruminação, hipertermia, mastite e episódios de abortamento.

A ausência de sinais clínicos evidencia a importância de animais assintomáticos na epidemiologia da leptospirose, pois, mesmo sem apresentarem sinais, são portadores e podem eliminar o agente por tempo indeterminado (CAMPOS Jr., 2006).

A leptospirose está incluída na lista do Código Sanitário para Animais Terrestres da Organização Internacional de Epizootias por ter propagação internacional, ser emergente, apresentar potencial zoonótico e difusão significativa nas populações humanas (OIE, 2009).

A leptospirose é considerada doença ocupacional, estando associada a determinados grupos profissionais, como magarefes, veterinários e laboratoristas (OLIVEIRA & NETO, 2007). A elevada positividade para *Leptospira* spp. no estudo, pode predispor ao aparecimento de leptospirose nos funcionários dos matadouros-

frigoríficos, uma vez que, as etapas do abate são realizadas sem uso de equipamentos de proteção individual (EPI's/luvas), associado ainda ao elevado número de animais abatidos por dia e o ritmo acelerado, determinando um contato íntimo com fluidos naturais dos bovinos abatidos.

As leptospiras penetram no organismo humano através de pequenas escoriações ou abrasões na pele, ou ainda através da pele íntegra quando este permanecer por longos períodos em contato com material contaminado. Ao atingirem a corrente circulatória as leptospiras multiplicam-se rapidamente. A fase de bacteremia pode durar de 1 a 7 dias, e é concomitante com o aparecimento de sintomas como febre e dores musculares (PEREIRA, 1996; FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

5.2 Imunohistoquímica (IHQ)

Foram observados três tipos de apresentação morfológica no tecido placentário evidenciados pela técnica de imunohistoquímica: (i) padrão filamentar – fortemente corado (coloração amarronzada destacada no fundo azul corado pela hematoxilina), presente principalmente no interstício do tecido placentário, com dimensões compatíveis com leptospiras; (ii) padrão granular - aparentemente livre no interstício ou presente no citoplasma dos macrófagos; (iii) padrão homogêneo – macrófagos com citoplasma difusamente corado.

No presente estudo foi considerada como reação positiva a presença de material filamentar isolado ou em combinação com as demais modalidades morfológicas. A positividade global das amostras analisadas atingiu 40% (n=40).

A imunohistoquímica para antígeno de *Leptospira spp.* mostrou aglomerados celulares distribuídos difusamente no tecido placentário principalmente na decídua basal, tanto extracelular quanto intracelularmente. A presença de antígenos de leptospiras no tecido placentário, marcando diferentes tipos celulares (macrófagos, células endoteliais e reticulares), sugere alta carga bacteriana infectante nas amostras positivas e indica que os mesmos têm um papel importante na patogênese da leptospirose.

Este resultado, até o momento é a primeira demonstração na literatura médica da presença de antígeno de leptospirose em tecido placentário de bovinos

abatidos em matadouros, por meio da técnica de imunohistoquímica, previamente bem documentado no fígado, rins, coração, pulmão, músculo esquelético e cardíaco e baço (De BRITO et al., 1987; ALVES, 1987; ALVES et al., 1992; UIP et al., 1992; RIEDEMANN et al., 1994; ZAMORA et al. 1995; BRANDESPIM et al., 2003; DUARTE NETO, 2010).

Com os resultados encontrados pela técnica de imunohistoquímica e os conhecimentos que constam na literatura especializada é possível inferir que o processo patogênico básico, na leptospirose, pode ser desencadeado pela ação direta da *Leptospira spp.* e seus produtos, nos tecidos.

5.3 Co-relação entre as Técnicas de SAM e IHQ

Pelo fato da técnica de Soroaglutinação Microscópica ser uma técnica quantitativa, esta foi considerada padrão-ouro para a validação das metodologias analisadas, demonstrando que a Imunohistoquímica para diagnóstico de *Leptospira spp.* em bovinos abatidos em matadouros frigoríficos apresentou Sensibilidade (Se) de 16% (10/64 x 100), e Especificidade (Es) de 17% (6/36 x 100) (Tabela 5).

TABELA 5. Comparação das técnicas Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Imunohistoquímica (IHQ), para determinação da Sensibilidade (Se) e Especificidade (Es) da técnica de IHQ

Imunohistoquímica (IHQ)	Soroaglutinação Microscópica (SAM)		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	10	30	40
Negativo	54	6	60
Total	64	36	100

A baixa sensibilidade da técnica de IHQ em relação à técnica de SAM poderia ser atribuída ao fato da primeira detectar apenas antígenos nos tecidos relacionados ao processo patológico. Em contrapartida, a técnica SAM detecta qualquer anticorpo direcionado contra proteínas estruturais e não-estruturais da *Leptospira spp.* A capacidade da técnica de SAM gerar sinal a partir de quantidades muito pequenas de anticorpos também poderia explicar a baixa sensibilidade da IHQ.

Apesar do valor de especificidade da técnica de IHQ ter sido baixa, em termos percentuais foi superior ao valor da sensibilidade e, este fato pode indicar ausência de interações não-imunológicas, ausência de reações cruzadas com outros agentes etiológicos antigenicamente relacionado à *Leptospira spp.*

Riedemann et al. (1994) utilizando a técnica de imunohistoquímica encontraram 20,60% de resultados positivos na pesquisa de antígeno de *Leptospira interrogans*, em cortes de tecido renal de roedores de vida livre. Entretanto, estes mesmos autores revelam que esta técnica pode não demonstrar um desempenho satisfatório e, portanto, não constituir-se em uma técnica de alta sensibilidade, em casos de infecções renais tardias em roedores. ZAMORA et al. (1995), encontraram 43% de roedores silvestres positivos para leptospirose, ao analisar os rins desses animais pela técnica de imunohistoquímica.

A reação padrão sorológica para diagnóstico da leptospirose é a Soroaglutinação Microscópica (SAM) com antígenos vivos, a qual é recomendada pela Organização Mundial de Saúde. A SAM é o procedimento laboratorial mais amplamente empregado para o diagnóstico etiológico da infecção animal (LILENBAUM, 1996; VASCONCELOS, 1997b). Segundo estes mesmos autores outros métodos diagnósticos são dispendiosos, de resultado demorado, aplicando-se apenas a casos individuais e ou animais de alto valor estimado ou econômico (BRASIL, 1994).

O índice de correlação Kappa (K), entre as técnicas SAM e IHQ foi inferior a 0.20, o que indica um grau desprezível de concordância entre as duas técnicas (JEKEL et al., 2006). O baixo percentual de positividade para a técnica IHQ (40%) influenciou a determinação do coeficiente Kappa, justificado pela pouca identificação de antígeno de *Leptospira spp.* nas amostras analisadas. Este dado

reforça a possibilidade de que, dependendo do período de patogenia da leptospirose, pode não haver identificação de antígenos *L. interrogans* nas amostras.

É importante ressaltar que a presente pesquisa demonstrou a frequência atual da infecção pela *Leptospira sp.* em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos no município de São Luís - MA. A soropositividade para *Leptospira spp.* representa a presença de animal portador e potenciais disseminadores da espiroqueta no rebanho e no local de abate. Portanto, no geral, o estudo realizado mostrou que a leptospirose consiste em mais um problema sanitário com o qual os produtores maranhenses têm de conviver.

Os dados de frequência aqui obtidos são preocupantes, já que os animais avaliados não eram vacinados, conforme avaliação das guias de trânsito animal (GTA) e do Serviço de Inspeção Municipal, portanto, os anticorpos encontrados, não são de origem vacinal. Os resultados obtidos demonstram pela avaliação sorológica que a infecção poderá não garantir a eles o “status” imunológico de proteção e que a imunidade do rebanho obtida pela infecção poderia ser reforçada pela vacinação.

Observa-se que são vários os parâmetros a serem avaliados em uma ocorrência de leptospirose, portanto, devido à complexidade do caráter multifatorial da enfermidade, maior conhecimento de sua epidemiologia reveste-se de significado para seu controle e conseqüente diminuição de seus graves impactos. Esta complexidade requer uma análise detalhada do ambiente, das espécies envolvidas e dos fatores de risco inerentes ao sistema de criação. Desta forma, as medidas de prevenção e controle da doença deverão se basear na interpretação das diversas variáveis encontradas, visando o sucesso da ação sanitária.

Em conseqüência das altas frequências de leptospirose, observadas no estudo, torna-se importante alertar sobre os mecanismos para o controle desta doença. Para a redução gradativa dos índices de soropositividade e prevenção de novas infecções é necessária a combinação de medidas de controle, como, remoção gradual de animais infectados, utilização de vacinas que permitam a diferenciação entre animais vacinados e infectados, realização de quarentena ao ingresso de bovinos na propriedade e, exames sorológicos anuais, buscando impedir a reintrodução dessa doença no rebanho. Além disso, nos matadouros-

frigoríficos é de extrema importância a adoção de boas práticas de manipulação com uso de equipamentos de proteção individual.

Diante do exposto, destaca-se a importância do aprimoramento dos sistemas de vigilância epidemiológica, visando à detecção precoce dos focos, à investigação etiológica e à avaliação de eventuais modificações na estrutura epidemiológica da zoonose. Para tal, seriam fundamentais investimentos de infraestrutura, que permitisse atuação oportuna, adequada e na amplitude necessária, o incremento dos sistemas de informações, bem como capacitação técnica. Nesta última, incluem-se alguns componentes fundamentais, como capacitação clínica para suspeita da infecção/enfermidade, colheita e envio adequado de amostras e suporte laboratorial.

Finalizando, destaca-se que a educação em saúde, faz-se fundamental para a implementação de medidas de profilaxia e controles, visando reduzir a magnitude da antropoonose e de seus impactos sanitários, econômicos e sociais.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados desta pesquisa pode-se concluir que:

1. A frequência de anticorpos *anti-Leptospira* spp. em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos no município de São Luís-MA foi elevado;
2. Os sorovares mais frequentes em ordem decrescente foram hadjo, grippotyphosa e wolffi;
3. Anticorpos contra o sorovar hardjo detectados neste trabalho apontam para a importância do bovino, considerado reservatório deste sorovar, na disseminação e manutenção da doença;
4. A técnica de imunohistoquímica, quando aplicado à tecido placentário, possibilita diagnóstico etiológico de leptospirose, entretanto, com baixa sensibilidade e especificidade configurando procedimento com especiais restrições;
5. Não houve concordância ($K < 0.2\%$) entre as técnicas de Soroaglutinação Microscópica e Imunohistoquímica no estudo;
6. A leptospirose constitui um problema de Saúde Pública para bovinos no estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª edición. Washington. **Organización Panamericana de la Salud**, 1986.

ADORNO, O.J.C. Leptospirose Bovina. Piracicaba, 2006, 17f. **Monografia** (Especialização em Reprodução de Bovinos) – Universidade Castelo Branco, UCB, 2006.

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

ALONSO, B.R.; HAZ, H.J.G.; PAZ, R.C. Leptospirosis humana: un problema de salud? **Rev. Cubana Salud Pública**, Havana, v.26, p. 27-34, 2000.

ALONSO-ANDICOBERRY, C.; GARCIA-PENA, F.J.; PEREIRA-BUENO, J.; COSTAS, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. Seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, v.52, p.109-117, 2001.

ALVES, V.A.F.; GAYOTTO, L.C.C.; DE BRITO, T.; SANTOS, R.T.M.; WAKAMATSU, A.; VIANNA, M.R.; SAKATA, E. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and the their relation morphogenesis of the liver damage. **Exp. Toxic. Pathology**, v.44, p.425-433, 1992.

ALVES, V.A.F.; VIANNA, M. R.; YASUDA, P.H.; DE BRITO, T. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **Journal of Pathology**, v. 151, p. 125-31, 1987.

ANZAI, T., WADA, R., OKUDA, T.; AOKI, T. 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, V.E.M.; MOREIRA, E.C.; NAVEGA, L.A.B.; SILVA, J.A.; CONTRERAS, R.L. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira* interrogans

em soros sangüíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n4, p.430-435, 2005.

AROKIANATHAN, D.; TROWER, K.; POOBONI, S.; SOSNOWSKI, A.; MOSS, P.; THAKER, H. Leptospirosis: a case report of a patient with pulmonary haemorrhage successfully managed with extra corporeal membrane oxygenation. **Journal of Infection**, v. 50, n. 2, p. 158-62, 2005.

BATRA, H.; CHANDIDRAMANI, N.K.; MANDOKHOT U.V. Clinical, bacteriological, serological, pathological and metabolic studies of *Leptospira interrogans* serovar wolffi infection in sheep. **Indian. J. Animal Sci.**, v.61, n.1, p.6-12, 1991.

BEZERRA, D.C. Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos leiteiros não vacinados no estado do Maranhão, São Luís, 2009. 101f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, 2009.

BEZERRA, D.C.; CHAVES, N.P.; GUERRA, P.C.; PEREIRA, H.M.; SANTOS, H.P. 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. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 931-937, 2010.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Disease**, 3, 757-771, 2003.

BOLIN, C. A.; CASSELS, J. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with monovalent *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjobovis* vaccine on type *hardjo*-bovis infection of cattle. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, n. 10, v. 52, p. 1639-1643, 1991.

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 6 Western Dairy Management Conference. Reno**, p. 155-160, 2003.

BRANDESPIM, D.F.; GIRIO, R. J. S.; LOPES, F.L.; MAGAJEVSKI, F.S.; NÜRMBERGER JUNIOR, R.; ALESSI, A. C. Infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorovar pomona em hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos: alterações estruturais e avaliação das técnicas de levaditi e imunistoquímica. **ARS Veterinária**, v. 19, n.3, p.272-279, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, 1994. 373p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Brasília, 2004. 200p.

CALDAS, E. M.; VIEGAS, E. A.; VIEGAS, S. A. R. A.; REIS, R. S. Aglutininas anti-leptospira em hemossoro de animais domésticos no Estado da Bahia, 1994/96 - II. **Arquivo de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 268-280. 1995.

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 antileptospira em machosbovinos na microrregião de Goiânia, **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 439-446, 2006.

CERVANTES, L.P.M.; PUEBLA, M.A.C.; ROSAS, D.G.; SERRANÍA, N.R.; BARRANCA, J.I.T. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.54, n.1, p.24-27, 2002.

CHAUDHRY, J.I.; KHAN, M.A.; AKHTAR, T.; KHAN, A.G.; CHAUDHRY, M.S. Seroprevalence of leptospirosis in buffaloes. **Buffalo Journal**, v.12, n.1, p.65-71, 1996.

COSTA, M.C.R.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.C.; MARTINS, N.R.S. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.1, p.11-17, 1998.

DE BRITO, T.; MORAIS, C.F.; YASUDA, P.H.; LANCELLOTTI, C.P.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; YAMASHIRO, E. Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic immunohistochemical

detection of leptospira antigen. **Ann. Trop. Med. Parasitology**, v.81, p.1-8, 1987.

DUARTE NETO, A.N. Patogenia do envolvimento esplênico na leptospirose grave com síndrome do choque séptico. São Paulo, 2010. 243f. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, USP, 2010.

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

FAINE, S. **Guidelines for the Control of Leptospirosis**. World Health Organization, Geneva. 1982, 171p.

FAINE, S. Leptospira and leptospirosis. **Med.Sci.**, Melbourne, 353p, 1999.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C. A.; PEROLA, T.P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: Australia, 1999.

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

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

FERESU, S. B. A. Serological survey to determine the most commonly occurring serovars of leptospira interrogans in the bovine population of Zimbabwe. **Israel Journal of veterinary Medicine**, v.44, n.1, p.25-30. 1988.

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

FIOCRUZ. Leptospirose. In: PORTAL FIOCRUZ. Webmaster FERRARI, R. Fundação Oswaldo Cruz – Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/glossário/leptospirose.htm>. Acesso em: Abril de 2011.

GERRITSEN, M.J.; KOOPMANS, M.J.; PETERSE, D. et al. Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. **Am. J. Vet. Res.**, v.55, p.1232-1237, 1994.

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

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

GIRO, R. J. S.; HERREIRA, R. C. P.; PEREIRA, F. J. G.; MATHIAS, L. A. Pesquisa de infecção por *Leptospira interrogans* em animais da região de Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, p. 87, 1998.

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

GOMES, A.H.B.; OLIVEIRA, F.C.; CAVALCANTI, L.A.; CONCEIÇÃO, I.R.; SANTOS, G.R. RAMALHO, E.J.; VIEGAS, S.A R. A.; Ocorrência de aglutininas anti-leptospira em soro de equinos no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.8, n.3, p.144-151, 2007.

GOYAL, S.M., MECH, L.M., NELSON, M.E. Prevalence of antibody titers to *Leptospira* spp in Minnesota white-tailed deer. **J. Wild. Dis.**, v. 28, n. 3, p. 445-448, 1992.

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.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.com.br>. Acesso em: Abril de 2011.

INGEBRIGTSEN, D.K., LUDWING, J.R., McCLURKIN, A. W. Occurrence of antibodies to the etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, leptospirosis and brucellosis in white-tailed deer in Minnesota. **J. Wild. Dis.**, v. 22, n. 1, p. 83-86, 1986.

JEKEL, J.F.; KATZ, D.L.; ELMORE, J.G. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 2006, 432p.

JULIANO, R. S. Estudo da prevalência e aspectos epizootológicos da leptospirose bovina, no bebanho de fêmeas mestiças produtoras de leite na microregião de Goiânia – GO. 1999. 60 f. **Dissertação** (Mestrado em Sanidade Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

KING, S. The prevalence of leptospirosis in cattle herds in the Western Division of New South Wales: a serological survey. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 9, p. 307-308, 1991.

KIRKBRIDE, C. A. **Laboratory Diagnosis of Livestock abortion**. 3 ed.. Ames: State University Press, 1990, p. 59-65.

KRIEG, N. R., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, Baltimore, v.1 , p. 62-67, 1986.

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

LANGONI H., MEIRELES L.R., GOTTSCHALK S. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 67, p.37-41, 2000.

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

LEVETT, P.N. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? **Applied Immunol.**, v.4, p.435-448, 2004.

LILENBAUM, W.; SANTOS, M. R. C.; BARBOSA, A. V. Leptospirose em reprodução animal: II. Bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Cien. Vet.**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1995.

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.18, p.9-13, 1996.

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

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

MARQUES, A.E. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de Goiás. Goiás, 2008. 87f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, UFG, 2008.

MASON, R.J., et al. *Leptospira interrogans* antibodies in feral pigs from New South Wales. **J. Wild. Dis.**, v.34, n.4, p. 738- 743, 1998.

MATHIAS, L.A., GIRIO, R.J.S., DUARTE, J.M.B. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. **J. Wild. Dis.**, v.35, n.1, p. 112-114, 1999.

MELO, L. E. H.; D'ANGELINO, J.L.; VASCONCELLOS, S.A.; RÊGO, E.W.; CASTRO, R.S.; SOARES, P.C.; SCHALCH, U.M.; PACHECO, J.G.C.; BENATTI, L.A.; WANDERLEY, P.A.; PINHEIRO, S.R. et al. Prevalência de vacas portadoras de anticorpos antileptospirosas em rebanhos produtores de leite do tipo C do Estado de São Paulo. In: **Congresso Brasileiro De Medicina Veterinária (CONBRAVET)**, São Paulo. Anais... São Paulo, 1999.

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

MILLER, D. A.; WILSON, M. A.; BERAN, G. W. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 11, p. 1761-1768, 1991.

MILNER, A.R.; WILKS, C.; CALVERT, K. The prevalence of antibodies to members of *Leptospira interrogans* in cattle. **Aust. Vet. J.**, v. 56, p.327-330, 1980.

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

MOREIRA, E. C.; SILVA, J. S.; VIANA, F. C.; SANTOS, W. L. M.; ANSELMO, F. P.; LEITE, R. C. Leptospirose bovina I. Aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. - UFMG**, v. 31, n. 3, p. 375-388, 1979.

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

NARBONA, J.M.; NODAL, M.R.; SILVÉRIO, V.H.; NODAL, A.R.; Leptospiriosis Humana. Revisión de tema. **Rev. Cub. Med. Gen. Integr.**, Havana, v.17, p.68-73, 2007.

NEW, J.C.Jr., WATHEN, W.G., DEUTKOWSKI, S. Prevalence of *Leptospira* antibodies in white-tailed deer, Cades Cove, Great Smoky Mountains National Park, Tennessee, U.S.A. **J. Wild. Dis.**, v.29, p.561-577, 1993.

NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFD, C.M.; GRAAF, E.A.M. **Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology**. Wageningen Pers: Wageningen. 1997, 445p.

OIE. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Chapter. 1.2. Criterio de inscripción de enfermedades en la lista de la OIE. p. 251-264, 2009. Disponible em: <http://www.oie.org>

<http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_sommaire.htm>. Acesso: Abril de 2011.

OIE. World Organisation for Animal Health Leptospirosis, 2006, Chapter 2.2.4. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm. Acesso: Abril de 2011.

OLIVEIRA, S. J.; NETO, J.S.P.; Leptospirose em suínos. **Revista de Suinocultura Industrial**, n.3, v.204, p.18-25, 2007.

PAVLOV, P.M. Aspects of the ecology of the feral pig (*Sus scrofa*) in semi-arid and tropical areas of eastern Australia. Melbourne, 1991. 325p. **Thesis** (PhD – Biology Science), Monash University Australia, 1991.

PELLEGRIN, A.O.; GUIMARÃES, P.H.S.; SERENO, J.R.B.; FIGUEIREDO, J.P.; LAGEA, P.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.C. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. **Comunicado Técnico**, Embrapa Pantanal, Corumbá, p.1-, 1999.

PEREIRA, H.C.P. Prevalência sorológica da leptospirose humana entre trabalhadores de frigoríficos e matadouros com Inspeção Estadual do Município de Pelotas-RS. 75. 1996. **Tese** (Mestrado), Fundação Universidade de Rio Grande - Rio Grande-RS.

POSPISSIL, T.T.F. **Leptospirose Eqüina**. 36f. Monografia (Especialização) - Diagnóstico e Cirurgia de Eqüinos da Faculdade de Jaguariúna/ Hospital Veterinário Jockey Club de São Paulo - Instituto Brasileiro de Pós-Graduação e Educação Continuada. São Paulo, 2007.

PRESCOTT, J. F.; MILLER, R. B.; NICHOLSON, V. M.; MARTIN, S. W.; LESNICK, T. Seroprevalence and Association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontário. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, n. 52, p. 210-215, 1988.

REZENDE, M.B.; LINS-LAINSON, Z.C.; BICHARA, C.N.C.; LEÃO, R.N.Q.; COSTA, P.M.; REZENDE JR, A.B.; **Leptospirose**. Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico. Ed. CEJUP, Universidade do Estado do Pará, Instituto Evandro Chagas, 1997.

RIBEIRO, S.C.A.; BOSCOLO, I.B.; GONÇALVES, G.F.; OLIVEIRA, P.R. Leptospirose no rebanho bovino da subregião de Nhecolândia, pantanal matogrossense, **Brasil. Vet. Notícias**, Uberlândia, v. 5, n. 1, p.51-55, 1999.

RIEDEMANN, S.; ZAMORA, J.; CABEZAS, X. Leptospirosis in wild rodents captured in Valdivia city. Serological and immunochemical diagnosis. **Revista Agro-Ciência**, v.10, n. 2, p. 133-38, 1994.

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, p.275-284, 2001.

ROLIM, M.B.Q. Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella abortus* em bovinos abatidos em matadouro público no Estado de Pernambuco. Recife, 2010. 57f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2008.

SAMBASIVA, N.G.R.R.; BHALLA, P.; AGARWAL, S.K.; Serodiagnosis of leptospirosis in Delhi using IgM enzyme linked immunosorbent assay, **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, p.557-558, 2004.

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

SANTIN, K.; SELLA, A. B.; NADVORNY, A.; WOLFFENBÜTTEL, S.; CARDOSO, M. R. I.; SCHMIDT, V.; Pesquisa de aglutininas antileptospira em cães clinicamente sadios e em cães com suspeita clínica de leptospirose. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.60, p. 48-52, 2006.

SANTOS, J.P.; SILVA, C.C.;TAVARES, T.C.F.; SEDLACEK, L.S.; ALMEIDA, M.M.; BITTAR, J.F.F.; MEDEIROS, A.A.; BITTAR, E.R.; PANETTO, J.C.C.; SANTOS, M.P.; Aglutininas anti-leptospíricas em gatos do município de Uberaba- MG. **Cien. Anim. Bras.**, Goiânia, n.1, p.41-43, nov., 2008.

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

SLACK, A.T; SYMONDS, M.L.; DOHNT, M.F.; SMYTHE, L.D.; The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998–2004. **Epidemiol. Infec.**, p.1217-1225, 2006.

STANCHI, N. O. Serological survey of leptospirosis in cattle in Buenos Aires Province. **Veterinaria Argentina**, v. 6, n. 56, p. 384-387, 1989.

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

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.184, n.6, p.722-725, 1984.

THOMPSON, J.A.; LEITE, R.M.H.; GONÇALVES, V.S.P.; LEITE, R.C.; BANDEIRA, D.A.; HERRMANN, G.P.; MOREIRA, E.C.; PRADO, P.E.F.; LOBATO, Z.I.P.; BRITO, C.P.T.; LAGE, A.P. Spatial hierarchical variances and agecovariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovarhardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Prev. Vet. Med.**, v. 76, p.290-301, 2006.

TOMAZELA, J. M. Rebanhos sofrem com aleptospirose. O Estado de São Paulo, São Paulo. **Suplemento Agrícola**, 9 jul. 1997.

TONIN, A.A.; AZEVEDO, M.I.; ESCOBAR, T.P.; CASASSOL A, I. SCHAEFER, P.C.; BADKE, M.R.T. Leptospirose bovina: aumento na incidência da *Leptospira interrogans* sorovar butembo no rebanho do estado de Santa Catarina, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.4, p.294-297, 2010.

UIP, D.E.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M.S. Diagnóstico precoce da leptospirose por demonstração de antígenos através de exame imunohistoquímico em músculo da panturrilha. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.34, n.5, p.375-381, 1992.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose bovina. **Atualização Técnica** – Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, n. 34, p. 1-5, 1997a.

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, 1997b, 6 p.

WANYANGU, S.W., OLUBAYO, R.O., ROSITTER, P.B. 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.

WEBSTER, J.P., ELLIS, W.A., MACDONALD, D.W. Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. **Epidemiology Infect.**, v.114, n.1, p.195-201, 1995.

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

ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S.; CABEZAS, X.; VEGA, S. Comparison of four microscopic techniques for the diagnosis of leptospirosis in wild rodents in the rural area of Valdivia, Chile. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 37, n. 3, p.267-272, 1995.