



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

VANESSA YUMI HASHIMOTO

**EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE BOVINA NO  
ESTADO DO PARANÁ**

---

Londrina  
2012

VANESSA YUMI HASHIMOTO

**EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE BOVINA NO  
ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal, da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor. Área de Concentração: Sanidade  
Animal

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

H348e	Hashimoto, Vanessa Yumi. Epidemiologia da leptospirose bovina no estado do Paraná / Vanessa Yumi Hashimoto. - Londrina, 2012. 92 f. : il.  Orientador: Julio Cesar de Freitas. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2012. Inclui bibliografia.  1. Leptospirose - Bovino - Paraná - Teses. 2. Bovino - Doenças - Teses. 3. Leptospirose - Epidemiologia - Teses. 4. Leptospira - Teses. I. Freitas, Julio Cesar de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.  CDU 619:636.2(816.2)
-------	--

VANESSA YUMI HASHIMOTO

**EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE BOVINA NO ESTADO DO  
PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência animal, da Universidade Estadual de  
Londrina, como requi sito parcial para a obtenção do  
título de Doutor. Área de Concentração: Sanidade  
Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Ernst Eckehardt Müller  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jane Megid  
UNESP – São Paulo – SP

---

Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Juliana Alves Dias  
EMBRAPA – Londrina – PR

Londrina, 27 de abril de 2012

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Leptospirose, Microbiologia e Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

## **DEDICO**

A Deus, pela sua presença constante em minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis.

A minha família, que é a origem de tudo. Toda a essência e os pilares do meu caráter foram fundamentados nos ensinamentos dos meus pais, Jorge e Marina, e pela convivência com minhas irmãs Cláudia e Joice, meus referenciais de amor, união, honestidade e dignidade.

A todos meus amigos pela amizade sincera.

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas, que me orienta e acompanha desde a iniciação científica, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Sua confiança e orientação foi capaz de me fazer trilhar por um crescimento profissional que julgava impossível em tão pouco tempo. Exemplo de profissionalismo e caráter, agradeço pelos anos de convívio, compartilhando experiências, conhecimentos e amizade.

Ao professor Dr. Amauri Alcindo Alfieri por me acolher em seu laboratório e pelos ensinamentos repassados para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Ernst Eckehardt Müller pelos ensinamentos transmitidos e pelas palavras de estímulo e amizade.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, Prof. Dr. João Luís Garcia e Prof<sup>l</sup>. Dr<sup>a</sup> Roberta Lemos Freire pelas contribuições.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Doutorado.

A minha querida amiga Juliana Alves Dias que tornou viável a realização deste trabalho, através da disponibilidade das amostras biológicas, assim como os ensinamentos repassados com paciência e dedicação. Aos anos de convivência, sincera amizade e companheirismo sempre constantes.

Aos companheiros de trabalho, Roberta T. Chideroli, Jean C.A. Barbara, Talita Brunhara, Juliane Ribeiro, Ana Luiza Ramos de Oliveira e Yeda Teixeira pela essencial ajuda prestada. Agradeço imensamente pelo árduo trabalho e que sem esta ajuda, com certeza este projeto não se realizaria.

A Aline Barry, Noemi R. Gardinali e Elis Lorenzetti pela ajuda e pelos ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho. Agradeço sinceramente pelas valiosas contribuições e pela amizade sincera.

A todos do Laboratório de Leptospirose e Microbiologia pelo carinho e amizade.

A todos os meus amigos queridos desde os tempos de infância até agora, os meus mais sinceros agradecimentos. Embora não nomeados, cada um de vocês sabem a importância que representam para mim. Devo a vocês boa parte dos momentos felizes que

tive em minha vida. Agradeço pela amizade e companheirismo em todos os momentos, pela dedicação e carinho sempre constantes. Agradeço a Deus por ter cada um de vocês em minha vida e os considero de uma importância difícil de se mensurar.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

Às leptospiros.....

HASHIMOTO, V.Y. **Epidemiologia da leptospirose bovina no estado do Paraná.** 2012. 92 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a epidemiologia da leptospirose em rebanhos bovinos com atividade reprodutiva do estado do Paraná. Para este estudo, o estado foi estratificado em sete circuitos produtores. O delineamento estatístico, as amostras sorológicas e as informações referentes às propriedades foram as empregadas para o estudo da brucelose bovina no Estado do Paraná, dentro do contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Foram determinados a prevalência de anticorpos-*Leptospira* spp, sua distribuição espacial e os fatores de risco associados à infecção no estado. Para todo o estado, foram avaliadas 14.163 fêmeas bovinas com idade > 24 meses, provenientes de 1.926 rebanhos não vacinados contra a leptospirose. As informações necessárias para o geoprocessamento foram obtidas durante as visitas as propriedades rurais, nas quais foram aplicados os questionários epidemiológicos para a obtenção de informações epidemiológicas e práticas de manejo empregadas e realizadas as coletas de amostras de sangue. Para o diagnóstico sorológico da infecção foi utilizada a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) com 22 sorovares de *Leptospira* spp. O programa ArcGIS 9 foi utilizado para a confecção do mapa de risco final, definindo as áreas de maior risco epidemiológico da enfermidade no estado. A prevalência de rebanhos e animais do estado foi de 54,28% [52,05-56,51] e 37,70% [34,54-40,86]. Nos circuitos produtores, a prevalência de rebanhos e animais foram respectivamente: circuito 1: 77,74% [72,44-82,45] e 41,13% [34,07-48,20]; circuito 2: 82,50% [77,53-86,76] e 47,29% [39,33-55,25]; circuito 3: 59,49% [53,42-65,35] e 34,89% [27,70-42,09]; circuito 4: 66,06% [60,12-71,65] e 48,09% [41,29-54,89]; circuito 5: 34,77% [29,19-40,67] e 22,96% [14,33-31,60]; circuito 6: 27,60% [22,44-33,24] e 28,59 [18,70-38,48]; circuito 7: 40,08% [34,04-46,35] e 24,43 [15,31-33,56]. As variáveis relacionadas à característica da população animal e ao manejo zootécnico dos rebanhos foram associadas à soropositividade à *Leptospira* spp no estado do Paraná. A visualização espacial dos rebanhos sororeagentes na SAM permitiu identificar as regiões noroeste/norte e sudoeste como as áreas de maior ocorrência e risco da enfermidade no estado. Estes resultados indicam que a leptospirose está amplamente distribuída no estado do Paraná e que fatores de risco relacionados às características das propriedades e ao manejo estão associados à infecção. Foi realizado o acompanhamento sorológico, molecular e tentativas de isolamento em amostras de urina de um único rebanho bovino de leite naturalmente infectado pela *Leptospira* spp, constituído por 50 fêmeas em idade reprodutiva, localizado na região norte do estado do Paraná. Os animais apresentavam histórico de abortamentos e infertilidades e não haviam sido vacinados contra a leptospirose. Entre novembro/2009 a abril/2011, foram realizadas cinco coletas de sangue e urina em intervalos regulares de quatro meses. Para a realização da SAM, foram colhidas amostras de sangue das 50 fêmeas do rebanho. Dentre estas, foram colhidas amostras de urina de 20 fêmeas com títulos de anticorpos > 1 00 na SAM para a realização da nested-PCR (n-PCR) e cultura para isolamento bacteriano. Adicionalmente, duas coletas de urina foram realizadas em cinco animais que apresentaram títulos de anticorpos < 100 na SAM para a realização da n-PCR. Os produtos amplificados na n-PCR foram sequenciados e a identidade das sequências foram comparadas com as depositadas no GeneBank, utilizando o programa BLAST. O perfil sorológico dos animais avaliados considerou o sorovar Hardjo como o mais provável em

todas as amostras de soros testadas, com títulos variando entre 20 e 1600. Em todas as coletas de urina realizadas, foi constatada a presença de animais positivos na n-PCR. A técnica de n-PCR foi capaz de detectar o DNA de leptospiros na urina de animais que apresentaram títulos de anticorpos  $> 100$  e  $< 100$  na SAM. As amostras de urina semeadas não apresentaram crescimento de *Leptospira* spp nas avaliações realizadas semanalmente. O sequenciamento realizado identificou 100% de homologia com a *Leptospira interrogans*. Este trabalho sugere que o sorovar Hardjo pode ser considerado como o provável sorovar circulante no rebanho e o causador dos problemas reprodutivos dos animais estudados. Os dados obtidos demonstram que os títulos mínimos considerados positivos ( $> 100$ ) na sorologia de bovinos infectados, principalmente para o sorovar Hardjo podem falhar em detectar animais positivos para a leptospirose. Este trabalho demonstrou que o estabelecimento de outros títulos como ponte de corte para este sorovar na SAM e a utilização da n-PCR podem ser considerados, principalmente para a identificação de animais portadores renais, o que possibilitaria o melhor controle da leptospirose bovina.

**Palavras-chave:** Prevalência. Fator de risco. Monitoramento. Diagnóstico. *Leptospira* spp.

HASHIMOTO, V.Y. 2012. **Epidemiology of bovine leptospirosis in the state of Paraná.** 2012. 92 p. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

## ABSTRACT

The present study aimed to study the epidemiology of *Leptospira* spp in cattle herds with reproductive activity of the state of Paraná. In this study, the state was stratified into seven producer circuits. The statistic delineation, the serum samples and information regarding of the selected farms, were the same employed in the study of bovine brucellosis for Paraná state in the context of National Program for Control and Eradication of Brucellosis and tuberculosis (PNCEBT). Were determined the prevalence of antibodies against *Leptospira* spp and their spatial distribution, as well as to identify the risk factors associated with infection in the state. For Paraná state, were tested 14.163 females aged > 24 months from 1.926 nonvaccinated herds. The information required for geoprocessing were obtained during visits to farms, which were applied in epidemiological surveys to obtain epidemiological information and management practices employed and performed the collection of blood samples. For serological diagnosis of infection was used microscopic agglutination test (MAT) with 22 serovars of *Leptospira* spp. The program ArcGIS9 was utilized to construct the final risk map, defining the areas of greatest epidemiological risk of the disease in the state. The prevalence of herds and animals of the state were 54,28% [52,05-56,51] and 37,70% [34,54-40,86]. In the producer circuits, herds and animal seroprevalence were, respectively: circuit 1: 77,74% [72,44-82,45] e 41,13% [34,07-48,20]; circuit 2: 82,50% [77,53-86,76] e 47,29% [39,33-55,25]; circuit 3: 59,49% [53,42-65,35] e 34,89% [27,70-42,09]; circuit 4: 66,06% [60,12-71,65] e 48,09% [41,29-54,89]; circuit 5: 34,77% [29,19-40,67] e 22,96% [14,33-31,60]; circuit 6: 27,60% [22,44-33,24] e 28,59 [18,70-38,48]; circuit 7: 40,08% [34,04-46,35] e 24,43 [15,31-33,56]. Variables related to the characteristic of the animal population and the management of livestock herds are associated with seropositivity to *Leptospira* spp in state of Paraná. The spatial visualization of the reagents herds in MAT identified the regions northwest/north and southwest as the areas of greatest risk and occurrence of the disease in the state. These results indicate that leptospirosis is widely distributed in the state of Paraná and risk factors related to the characteristics of the properties and management are associated with infection. Were performed a serological, molecular monitoring and isolation attempts in urine samples from a single dairy cattle herd naturally infected with *Leptospira* spp, consisting of 50 cows in reproductive age, located in north region of Paraná state. The animals had a history of abortions and infertility and had not been vaccinated against leptospirosis. Among november/2009 to april/2011, were performed five blood and urine collections at regular intervals of four mounths. To perform microscopic agglutination test (MAT), blood samples were collected from 50 females of the herd. Among these, were collected urine samples from 20 cows with antibody titles > 100 in MAT to perform n-PCR and culture for bacterial isolation. Additionally, two urine collections were performed in five animals with antibody titles < 100 in MAT to perform n-PCR. The amplified products in n-PCR were sequenced and the identity of the sequences were compared to those deposited in GeneBank, using BLAST program. The serological profile of the evaluated animals considered serovar Hardjo as the most probably in all serum samples tested and the titles detected ranged from 20 to 1600. In all urine collections performed, the presence of positive animals in n-PCR were confirmed. The n-PCR technique was capable of detecting leptospire in urine from animals

that had antibody titles  $> 100$  and  $< 100$  in MAT. Urine samples seeded showed no growth of *Leptospira* spp in evaluations performed weekly. The sequencing performed identified 100% homology with *Leptospira interrogans*. This study suggests that serovar Hardjo may be considered the most probably serovar circulating in the herdy and the cause of the reproductive problems in the animals studied. The results obtained show that the minimum titles considered positives ( $> 100$ ) in serology of infected cattle, mainly to serovar Hardjo may fail to detect positive animals for leptospirosis. The establishment of other titles as cutoff points for this serovar in MAT and the use of n-PCR can be considered, particularly for the identification of renal carriers, which would allow better control of bovine leptospirosis.

**Key-words:** Prevalence. Risk factors. Monitoring. Diagnosis. *Leptospira* spp.

## LISTA DE FIGURAS

### **Situação epidemiológica da leptospirose bovina no estado do Paraná**

- Fig.1** –Mapa do estado do Paraná, demonstrando os circuitos e respectivos núcleos regionais..... 62
- Fig.2** –Distribuição espacial das áreas de risco para leptospirose bovina em propriedades localizadas no estado do Paraná..... 62

### **Prevalência e fatores de risco associados à leptospirose em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná**

- Fig.1** –Mapa do estado do Paraná demonstrando a região centro-sul, alvo do presente estudo..... 77
- Fig.2** –Diagrama de blocos mostrando a dispersão do tamanho dos rebanhos de acordo com o sistema de exploração na região centro-sul do estado do Paraná ..... 78

## LISTA DE QUADROS

### **Situação epidemiológica da leptospirose bovina no estado do Paraná**

- Quadro 1** – Dados censitários da população bovina do estado do Paraná em 2001, segundo circuitos produtores ..... 56
- Quadro 2** – Prevalência de animais sororeagentes para leptospirose, segundo circuito produtor, no estado do Paraná, 2001- 2002 ..... 56
- Quadro 3** – Prevalência de focos de leptospirose em propriedades, segundo circuito produtor, no estado do Paraná, 2001- 2002 ..... 57
- Quadro 4** – Prevalência de focos de leptospirose por tipo de exploração zootécnica, segundo circuito produtor, no estado do Paraná, 2001- 2002..... 57
- Quadro 5** – Sorovares de *Leptospira* spp prevalentes nos animais sororeagentes do estado do Paraná, 2001 - 2002 ..... 58
- Quadro 6** – Sorovares de *Leptospira* spp prevalentes nas propriedades positivas no estado do Paraná, 2001 - 2002 ..... 59
- Quadro 7** – Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para à infecção por qualquer sorovar de *Leptospira* spp em rebanhos bovinos do estado do Paraná, 2001 - 2002 ..... 60
- Quadro 8** – Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para à infecção pelo sorovar Hardjo em rebanhos bovinos do estado do Paraná, 2001 - 2002 ..... 60
- Quadro 9** – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados à infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp em rebanhos com atividade reprodutiva do estado do Paraná, 2001 - 2002..... 61
- Quadro 10** – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados à infecção pelo sorovar Hardjo em rebanhos com atividade reprodutiva do estado do Paraná, 2001- 2002..... 61

### **Prevalência e fatores de risco associados à leptospirose em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná**

- Quadro 1** – Prevalência aparente de focos de leptospirose estratificada por tipo de exploração zootécnica da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002..... 75

<b>Quadro 2</b> – Sorovares de <i>Leptospira</i> spp prevalentes nas propriedades positivas da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.....	75
<b>Quadro 3</b> – Distribuição das variáveis analisadas associadas à infecção para qualquer sorovar de <i>Leptospira</i> spp em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.....	76
<b>Quadro 4</b> – Distribuição das variáveis analisadas associadas à infecção pelo sorovar Hardjo em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.....	76
<b>Quadro 5</b> – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados à infecção para qualquer sorovar de <i>Leptospira</i> spp em rebanhos com atividade reprodutiva da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.....	77
<b>Quadro 6</b> – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados à infecção pelo sorovar Hardjo em rebanhos com atividade reprodutiva da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.....	77

### **Monitoramento sorológico e molecular de um rebanho bovino de leite naturalmente infectado pela *Leptospira* spp**

<b>Quadro 1</b> – Resultados dos exames sorológicos e da n-PCR realizada em amostras de urina colhidas de fêmeas bovinas provenientes de uma propriedade rural localizada na região norte do estado do Paraná, 2012.....	90
<b>Quadro 2</b> – Resultados da n-PCR realizada em amostras de urina colhidas de cinco fêmeas bovinas com títulos de anticorpos < 100 para o sorovar Hardjo, provenientes de uma propriedade rural localizada na região norte do estado do Paraná, 2012 .....	91

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
	Tópicos sobre a Leptospirose Bovina.....	17
	Topics of Bovine Leptospirosis.....	17
	Aspectos Históricos.....	18
	Etiologia.....	19
	Patogenia e Sinais Clínicos.....	21
	Epidemiologia.....	22
	Diagnóstico Laboratorial.....	24
	Controle e Prevenção.....	27
	Vacinas.....	28
	Referências.....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
2.1	OBJETIVO GERAL.....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>3</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	40
3.1	SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE BOVINA NO ESTADO DO PARANÁ.....	40
3.1.1	Introdução.....	42
3.1.2	Material e Métodos.....	42
3.1.2.1	População estudada.....	42
3.1.2.2	Delineamento amostral.....	43
3.1.2.3	Coleta das amostras de sangue e dados epidemiológicos.....	44
3.1.2.4	Teste sorológico.....	45
3.1.2.5	Cálculos de prevalência.....	45
3.1.2.6	Estudo dos fatores de risco.....	46
3.1.2.7	Geoprocessamento.....	47
3.1.3	Resultados.....	48
3.1.3.1	Prevalência de <i>Leptospira</i> spp em animais e rebanhos.....	48
3.1.3.2	Prevalência de sorovares de <i>Leptospira</i> spp.....	48
3.1.3.3	Análise dos fatores de risco.....	48

3.1.3.4	Geoprocessamento.....	49
3.1.4	Discussão.....	49
	Agradecimentos.....	53
	Referências.....	53
<b>4</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>63</b>
4.1	PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À LEPTOSPIROSE EM REBANHOS BOVINOS DA REGIÃO CENTRO-SUL DO ESTADO DO PARANÁ.....	63
4.1.1	Introdução.....	64
4.1.2	Material e Métodos.....	65
4.1.2.1	População estudada.....	65
4.1.2.2	Delineamento amostral.....	66
4.1.2.3	Colheita das amostras de sangue e dados epidemiológicos.....	67
4.1.2.4	Teste sorológico.....	67
4.1.2.5	Análise de dados.....	68
4.1.3	Resultados.....	69
4.1.3.1	Caracterização da amostra.....	69
4.1.3.2	Prevalência de propriedades reagentes.....	69
4.1.3.3	Análise dos fatores de risco.....	70
4.1.4	Discussão.....	70
	Agradecimentos.....	72
	Referências.....	73
<b>5</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>79</b>
5.1	MONITORAMENTO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE UM REBANHO DE LEITE NATURALMENTE INFECTADO PELA <i>LEPTOSPIRA SPP</i> .....	79
5.1.1	Introdução.....	80
5.1.2	Material e Métodos.....	81
5.1.2.1	Animais utilizados.....	81
5.1.2.2	Coleta de amostras.....	81
5.1.2.3	SAM.....	82
5.1.2.4	Cultura de <i>Leptospira spp</i> .....	83
5.1.2.5	Nested-PCR.....	83
5.1.2.6	Sequenciamento.....	84

5.1.3	Resultados .....	84
5.1.4	Discussão.....	84
	Agradecimentos .....	87
	Referências .....	87
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### Tópicos sobre a Leptospirose Bovina

**Resumo:** A leptospirose bovina é considerada amplamente disseminada, responsável por prejuízos econômicos na pecuária mundial devido a interferência na performance reprodutiva dos animais afetados. Muitos são os sorovares envolvidos na leptospirose bovina, entretanto o sorovar Hardjo tem sido considerado o mais frequente em todo o mundo e o causador de maior impacto na eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos infectados. Nas criações de bovinos, a disseminação de leptospiras é caracterizada principalmente pela presença de animais infectados ou portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina de forma intermitente por longos períodos, mantendo a infecção endêmica no rebanho. Como o quadro clínico da leptospirose bovina é comum a outras doenças infecciosas da esfera reprodutiva, o diagnóstico da infecção deve relacionar os sinais clínicos, as evidências epidemiológicas e os exames laboratoriais. O diagnóstico laboratorial pode ser baseado na detecção de anticorpos e detecção do agente ou do material genético da bactéria. As principais recomendações para o controle da leptospirose bovina estão relacionadas à identificação dos sorovares prevalentes no rebanho, a detecção da fonte de infecção e dos animais infectados, imunoprofilaxia e antibioticoterapia nos animais portadores e enfermos. A proteção específica dos animais suscetíveis é obtida com o uso de vacinas polivalentes que contenham os sorovares de leptospiras mais importantes para os bovinos. A vacinação e a realização de testes sorológicos regulares são consideradas as medidas profiláticas eficazes no controle de novos surtos da enfermidade.

**Palavras-chave:** Leptospira. Epidemiologia. Diagnóstico. Controle

### Topics of Bovine Leptospirosis

**Abstract:** Bovine leptospirosis is considered widespread, responsible for economic losses in livestock world due to interference on the reproductive performance of affected animals. Many are the serovars involved in bovine leptospirosis, however the serovar Hardjo has been considered the most common worldwide and cause the greatest impact on reproductive efficiency of cattle herds infected. In farms, the spread of leptospiras is mainly characterized by the presence of affected animals or asymptomatic carriers that eliminate the bacteria in the urine intermittently for long periods, maintaining an endemic infection in the herd. The clinical features of bovine leptospirosis is common to other infectious diseases of reproduction, thus the diagnosis of infection must relate the clinical signs, epidemiological evidence and laboratory tests. The laboratory diagnosis can be based on the detection of antibodies and detection of the agent or the genetic material of bacteria. The principal recommendations for the control of bovine leptospirosis are related to the identification of prevalent serovars in the herd, the detection of the source of infection and infected animals, immunoprohylaxis and antibiotic treatment in carriers and infected animals. The specific protection of susceptible animals is obtained from the use of polyvalent vaccines containing serovars of leptospiras most important for cattle. Vaccination and serological tests are considered effective prophylatic measures to control new outbreaks of the disease.

**Key-words:** Leptospira. Cattle. Epidemiology. Diagnosis. Control

## Aspectos Históricos

Diversas epidemias de uma doença icterica de característica infecciosa, com disfunção renal, foram observadas em seres humanos e documentadas até o final do século XVIII, entretanto suas causas eram desconhecidas (Faine et al., 1999).

A síndrome icterica com falência renal foi descrita pela primeira vez em 1812 no Cairo, por Larrey, médico militar francês, sendo posteriormente mencionada por Landouzy em 1883, que detectou a doença em funcionários de limpeza de esgoto em Paris, denominando-a como "typhus hépatique grave" (Faine et al., 1999). Entretanto, foi em 1886, que Adolf Weil, descreveu minuciosamente a enfermidade, após observar casos clínicos em seres humanos. No ano de 1887, a doença foi denominada, por Goldschmidt, como Síndrome de Weil, considerada a forma mais grave da leptospirose humana (Feigin; Anderson, 1975; Faine et al., 1999; Levett, 2001).

Em 1907, Stimson demonstrou através da coloração por prata, a presença de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente falecido de febre amarela. As espiroquetas apresentavam ganchos em suas extremidades e foram denominadas por Stimson de *Spirochaeta interrogans* (Faine et al., 1999).

No Japão, Inada e Ido, em 1914, a partir da inoculação de sangue humano com síndrome de Weil em cobaias, comprovaram ser uma espiroqueta o agente causador. Os mesmos autores, um ano mais tarde, concluíram que a síndrome de Weil era causada por espiroquetas por eles isoladas, às quais deram o nome de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. A partir de então, muitos progressos foram realizados no estudo da leptospirose e no ano de 1918, Noguchi criou o gênero *Leptospira* (Faine et al., 1999).

No Brasil, a leptospirose foi reconhecida pela primeira vez no Pará, por McDowel em 1917 (McDowel, 1917). No mesmo ano, Aragão verificou a presença de *Leptospira icterohaemorrhagiae* ao estudar seis *Rattus norvegicus* da cidade do Rio de Janeiro (Aragão, 1917). Posteriormente, diversos estudos sobre a leptospirose foram conduzidos no país (Smillie, 1921; Fonseca & Prado, 1932; Sefton, 1938, Noronha de Miranda, 1946).

Entretanto, somente no final da década de 30, a leptospirose passou a ser reconhecida como um problema de saúde pública e animal e, conseqüentemente, identificada como uma doença ocupacional, tendo como fator comum a exposição direta a tecidos ou urina de animais contendo leptospiras (Health; Johnson, 1994; Faine et al., 1999).

## Etiologia

A leptospirose é causada por bactérias da ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. Neste gênero estão reunidos os micro-organismos com morfologia filamentosa, espiralados, visualizados em microscopia de campo escuro e de contraste de fase, com afinidade tintorial pelos corantes argênticos. As leptospirosas são bactérias com 0,1 a 0,2 µm de diâmetro por 6 a 20 µm de comprimento, móveis, aeróbias, com elevados requerimentos nutricionais, sendo altamente sensíveis a ambientes secos, pH e temperaturas extremas (Faine et al., 1999).

A organização estrutural e a composição química das células de leptospirosas são semelhantes às de outras bactérias gram-negativas (Haake, 2000). Apresentam três elementos celulares básicos: a membrana externa que envolve toda a célula, os filamentos axiais denominados flagelos periplasmáticos e o cilindro protoplasmático que inclui a capa de peptidoglicano da parede celular e a membrana celular (Faine et al., 1999). A camada de peptidoglicano encontra-se associada à membrana celular, diferente das bactérias gram-negativas, que possuem a camada de peptidoglicano associada à membrana externa (Haake & Matsunaga, 2002).

A membrana externa das leptospirosas possui uma porção fosfolipídica e uma porção constituída de lipopolissacarídeo (LPS), semelhante às outras bactérias gram-negativas, exceto por apresentar menor atividade endotóxica (Faine et al., 1999). O LPS é constituído de um lipídio complexo (lipídeo A), ao qual está ligado um polissacarídeo chamado antígeno "O", que se projeta para a superfície da célula. Os açúcares que formam a cadeia lateral deste antígeno "O" são responsáveis pelas características antigênicas das bactérias, variando de espécie para espécie e entre estirpes de uma mesma espécie de bactéria (Carvalho; Alterthum, 2002).

O polissacarídeo "O" do LPS, considerado importante determinante antigênico, é utilizado para a classificação sorológica, agrupando as leptospirosas em diferentes sorovares, sendo estes considerados a unidade taxonômica (Faine et al., 1999). Cada sorovar é representado por uma estirpe de referência, determinado através de testes de aglutinação cruzada e teste de absorção de aglutininas. Os sorovares que apresentam alguma semelhança sorológica, mas ainda mostram diferenças antigênicas individuais são agrupados em sorogrupos.

O gênero *Leptospira* foi inicialmente dividido, baseado em características antigênicas, em duas espécies: *Leptospira interrogans*, que engloba grande número de

variedades patogênicas e *Leptospira biflexa*, uma variedade de comportamento saprófita (Levett, 2001). Esta divisão, com base em critérios relacionados às reações sorológicas, apresenta na atualidade mais de 320 sorovares de leptospiros patogênicos e saprófitas (Adler; Moctezuma, 2010).

Em 1987, os pesquisadores Yasuda, Steigerwalt e Sulzer (1987), demonstraram a heterogeneidade genética das leptospiros através de estudos de hibridização do DNA. Em 1992, o Subcomitê em Taxonomia propôs uma nova classificação, baseada na diferenciação molecular entre os diversos sorovares, dividindo o gênero *Leptospira* em seis novas espécies patogênicas: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. kirschneri* (Quiin et al., 1994).

Em 1994, o grupo de Genética Molecular de Leptospiros do Instituto Pasteur de Paris, utilizando o método de hidroxapatita no estudo da relação entre o DNA dos diversos sorovares de leptospiros, propôs um modelo de classificação em espécies genômicas ou genomespécies, incluindo novas espécies às acima citadas (Langoni, 1999).

Recentemente, o gênero *Leptospira* foi reclassificado, segundo características genotípicas, em 13 genomespécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomespécie 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomespécie 3), *L. weilii*, *L. wolffii* e seis genomespécies saprófitas: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomespécie 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomespécie 4) e *L. wolbachii* (Adler; Moctezuma, 2010).

As genomespécies de *Leptospira* não correspondem obrigatoriamente aos sorogrupos e sorovares existentes na classificação sorológica e estudos realizados incluíram múltiplas estirpes de alguns sorovares em diferentes genomespécies, demonstrando a heterogeneidade genética dentro dos sorovares (Brenner et al., 1999; Feresu et al., 1999).

A reclassificação das leptospiros com base genotípica é taxonomicamente correta e prevê uma forte tendência para a classificação futura. Porém, a classificação molecular é problemática para o microbiologista clínico, porque é incompatível com o sistema de sorogrupos, utilizado por anos. Até que seja desenvolvido um método simples de identificação, baseado no DNA será necessário que os laboratórios clínicos utilizem a classificação tradicional das leptospiros (Levett, 2001).

## Patogenia e Sinais Clínicos

A penetração do micro-organismo pode ocorrer ativamente através das mucosas e da pele escarificada. A penetração da leptospira na pele íntegra pode ocorrer em condições especiais que favoreçam a dilatação dos poros, como ocorre com a permanência prolongada em águas contaminadas. As leptospiras multiplicam-se no espaço intersticial e nos humores orgânicos (sangue, linfa e liquor), caracterizando um quadro agudo septicêmico denominado leptospiremia (Myers, 1985). As lesões primárias são atribuídas à ação mecânica do micro-organismo nas células endoteliais de revestimento vascular. A consequência direta das lesões dos pequenos vasos é o derrame sanguíneo para os tecidos (hemorragias), a formação de trombos e o bloqueio do aporte sanguíneo nas áreas acometidas durante a fase aguda da infecção (Brasil, 1995).

Aproximadamente dez dias após o início da infecção, os anticorpos surgem na circulação, promovendo a eliminação das leptospiras da corrente sanguínea e da maioria dos órgãos acometidos. Entretanto, as leptospiras podem localizar-se no rim e trato genital, podendo persistir por períodos prolongados e serem eliminadas por semanas a meses após a infecção (Faine, 1982).

A persistência de leptospiras no rim pode ocasionar desde pequenos infiltrados inflamatórios focais a extensas lesões, caracterizadas por necrose celular, atrofia tubular e hemorragia renal, seguido de cicatrização e localização de leptospiras na superfície luminal das células tubulares, sendo então eliminadas pela urina (Faine, 1982; Baskerville, 1986). A excreção de leptospiras pela urina é intermitente e pode ser de longa duração, dependendo dos hospedeiros animais acometidos e do sorovar infectante (Faine, 1982).

Nos bovinos, as leptospiras podem colonizar diferentes estruturas do aparelho genital das fêmeas bovinas (útero, ovário, oviduto e vagina) e dos machos (testículos, epidídimo e vesícula seminal), comprometendo a performance reprodutiva (Ellis, 1994, Faine et al., 1999).

Os sinais clínicos associados à leptospirose dependem do sorovar infectante e do hospedeiro infectado (Bolin; Alt, 1999). Nos hospedeiros de manutenção, a leptospirose é geralmente caracterizada por baixa resposta sorológica, discretos sinais clínicos e prolongado estado de portador renal, que pode estar associado à doença renal crônica. Nos hospedeiros acidentais, a leptospirose causa severa doença, associada a altos títulos de anticorpos aglutinantes, com curto estado de portador renal (Faine e al., 1999).

Os sinais clínicos da leptospirose em bovinos podem ser divididos em duas fases distintas: a aguda, que coincide com a leptospiremia e observada com maior frequência em rebanhos jovens e a crônica, de ocorrência mais tardia e com efeitos mais aparentes no trato genital (Ellis, 1984). Esta última fase, geralmente associada ao sorovar Hardjo, pode resultar em abortamentos, natimortalidade, nascimento de bezerros debilitados e, raramente, mumificação fetal (Dhaliwal et al., 1996).

Os abortamentos causados pelo sorovar Hardjo podem ocorrer em qualquer fase da gestação, além de ocorrer o aumento na ocorrência de perdas embrionárias e, conseqüentemente, ao aumento do número de doses de sêmen utilizadas por prenhez (Faine, 1982; Ellis, 1984; Ellis et al., 1985).

## Epidemiologia

A leptospirose é considerada uma zoonose amplamente disseminada, responsável por prejuízos econômicos na pecuária devido a interferência na performance dos animais infectados e gastos com tratamentos (Brasil, 2004). Os animais são considerados hospedeiros essenciais para a persistência da infecção e os humanos são hospedeiros acidentais, pouco eficientes na perpetuação da enfermidade.

Na espécie bovina, esta enfermidade é responsável por elevadas perdas econômicas na pecuária mundial devido ao comprometimento no desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos (Ellis, 1994). Embora no Brasil não existam informações epidemiológicas abrangentes, que possibilitem a determinação de sua real conotação econômica, estudos isolados fundamentam a hipótese de que a enfermidade em bovinos seja considerada endêmica (Favero et al. 2002, Genovez et al. 2004, Castro et al. 2008, Figueiredo et al. 2009, Hashimoto et al., 2010) e participe como importante causa de baixa produtividade na pecuária nacional (Guimarães et al., 1982/83).

Animais suscetíveis podem se infectar com diferentes sorovares de leptospirosas, entretanto, somente alguns sorovares são endêmicos em determinadas regiões ou países. Apesar das leptospirosas não possuírem hospedeiros específicos, observa-se a existência de hospedeiros preferenciais, que se comportam como reservatórios, sendo estes, os principais responsáveis pela persistência da infecção em diferentes ecossistemas (Guimarães et al., 1982/83; Health; Johnson, 1994; Levett, 1999).

O sorovar Hardjo é considerado o mais adaptado à espécie bovina, que pode comportar-se como reservatório, mantendo a doença no rebanho (Moreira, 1994). Uma vez

introduzido em um rebanho, este sorovar estabelece níveis variáveis de infecção, podendo persistir por longos períodos (Hathaway et al., 1986). No Brasil, este sorovar é considerado um dos mais difundidos nesta espécie animal (Oliveira et al., 2001; Homem et al., 2001; Araujo et al., 2005; Castro et al., 2008; Figueiredo et al., 2009; Oliveira et al., 2009). A predominância do sorovar Hardjo em bovinos no Brasil concorda com estudos realizados em outros países, evidenciando que nos últimos anos este sorovar tem sido o mais frequente em bovinos de diversos continentes.

Apesar do sorovar Hardjo ser considerado o mais prevalente nos inquéritos sorológicos realizados em bovinos, faltam isolamentos para a confirmação dos sorovares circulantes no Brasil. Os poucos dados referentes as leptospiros isoladas no país demonstram a necessidade de novos trabalhos que visem o isolamento e a identificação dos sorovares envolvidos com esta espécie animal, uma vez que a ocorrência de alguns sorovares pode estar restrita a determinadas áreas geográficas (Miller et al., 1991).

Nas criações de bovinos, a disseminação de leptospiros é caracterizada principalmente pela presença de animais infectados ou portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina de forma intermitente por longos períodos, mantendo a doença endêmica na propriedade. A eliminação do micro-organismo também pode ocorrer através de descargas uterinas pós-aborto, feto ou placenta infectada, infecções uterinas, sêmen e são consideradas também importantes para a disseminação e manutenção de leptospiros nos rebanhos bovinos acometidos (Ellis, 1994).

A transmissão indireta pode ocorrer através de ambiente ou material contaminado, sendo de grande importância na ocorrência de infecções acidentais. Estas infecções são decorrentes do contato e transmissão de leptospiros carreadas por outras espécies animais e estão diretamente relacionadas às características de manejo dos animais e fatores ambientais (Faine, 1982; Ellis, 1984).

O conhecimento das particularidades da *Leptospira* spp, manifestações clínicas, formas de transmissão e hospedeiros suscetíveis é essencial para a identificação de variáveis que possam estar envolvidas com a introdução e manutenção do micro-organismo no rebanho. Com base em levantamentos sorológicos, estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar os fatores de risco associados à soropositividade a *Leptospira* spp.

Características do rebanho, como tamanho e densidade populacional, são descritos como fatores de risco para a *Leptospira* spp (Castro et al., 2008; Oliveira et al., 2010). A associação entre tamanho do rebanho e a soropositividade para a *Leptospira* spp pode ser atribuída pelo aumento da probabilidade da ocorrência da leptospirose em rebanhos

maiores, tornando-a persistente e de difícil controle e erradicação. Assim, um número elevado de animais no rebanho significa maior risco de introdução e disseminação da enfermidade (Oliveira et al., 2010)

Vários autores citam a compra de animais como o principal fator de introdução da *Leptospira* spp no rebanho. Castro et al. (2008) estudando os fatores de risco para a *Leptospira* spp em rebanhos bovinos em idade reprodutiva no estado de São Paulo, demonstraram que propriedades que compravam animais apresentavam 3,13 vezes mais chances de serem positivas que propriedades fechadas.

O tipo de exploração foi considerado fator de risco no estudo realizado por Figueiredo et al. (2009) que relataram que rebanhos provenientes da exploração do tipo corte apresentaram 12,17 vezes mais chances de serem positivas quando comparados com o tipo leite ou misto. Prescott et al. (1988) consideraram os rebanhos de corte como mais suscetíveis em relação ao rebanhos leiteiros e que isto possivelmente esteja relacionado com as práticas de manejo empregadas neste tipo de exploração zootécnica.

A presença de suínos, cães, equinos e animais silvestres podem ser considerados importantes na ocorrência da leptospirose (Oliveira et al., 2010). O estreito convívio dos bovinos com estes animais podem propiciar a disseminação da enfermidade entre estas espécies.

### Diagnóstico Laboratorial

O quadro clínico da leptospirose bovina é comum a outras doenças infecciosas da esfera reprodutiva, assim o diagnóstico da infecção deve relacionar os sinais clínicos, as evidências epidemiológicas e os exames laboratoriais (Faine, 1982; Ellis, 1984). O diagnóstico pode ser realizado por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção de anticorpos e detecção do agente ou do material genético da bactéria (Faine et al., 1999).

A visualização direta de leptospiros em microscópio de campo escuro tem sido utilizada principalmente em amostras de urina durante a fase de leptospiúria. Entretanto, este teste apresenta como principais limitações: baixa sensibilidade, necessidade de observador experiente para diferenciar leptospiros de artefatos presentes nas amostras e ocorrência de eliminação de leptospiros pela urina de forma intermitente (Faine et al., 1999).

O isolamento da *Leptospira* spp é considerado a técnica definitiva no diagnóstico da leptospirose, proporcionando a identificação do sorovar infectante. Leptospiros têm sido isoladas principalmente a partir da urina, rim, útero e abortos bovinos (De Lange et

al. 1987; McClintock et al., 1993; Zacarias et al., 2008). É considerada uma técnica laboriosa, necessitando de acompanhamento semanal, podendo levar meses para apresentar qualquer crescimento.

Dentre os métodos laboratoriais, a prova de soroaglutinação microscópica é a mais utilizada para o diagnóstico da leptospirose (Faine et al., 1999). A técnica consiste na reação entre anticorpos presentes no soro contra os antígenos encontrados na superfície da leptospira (Levett, 2001). A SAM detecta tanto anticorpos do isotipo IgM quanto IgG, sendo a sua resposta indicativa do possível sorovar infectante. Entretanto, a caracterização infectante só é possível através do isolamento e identificação do agente (Guimarães et al., 1982/83). A especificidade e a sensibilidade da SAM são altas, entretanto esta técnica apresenta limitações, como: a sensibilidade declina à medida que aumenta o tempo decorrido após a infecção, não diferencia títulos vacinais e não vacinais, reações cruzadas entre sorovares e algumas infecções latentes podem não ser identificadas. Para a sua realização é necessária infra-estrutura mínima para a manutenção dos antígenos, limitando a sua realização aos centros de pesquisa ou ensino (Faine et al., 1999).

Nos últimos anos tem havido grande esforço para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis, seja através da detecção de anticorpos ou identificação de antígenos (Levett, 2001; McBride et al., 2005). Para obter melhora no diagnóstico laboratorial, novos testes sorológicos nos formatos ELISA, Dipstick, Immunoblot e Dot-ELISA foram descritos, mas, embora sensíveis, continuam sorovar-específicos (Petchclai; Hiranras; Potha, 1991; Ribeiro; Souza; Almeida, 1995; Da Silva et al., 1997; Gussenhoven et al., 1997; Yan et al., 1999; Levett & Branch, 2002). Testes moleculares como o "dot-blotting" (Terpstra; Schoone; Ter, 1986) ou hibridização *in situ* (Terpstra et al., 1987) foram descritos. Porém, a técnica molecular mais amplamente utilizada para diagnóstico da leptospirose é a da reação em cadeia da polimerase (PCR).

A PCR vem sendo utilizada de forma crescente para o diagnóstico precoce da leptospirose no homem e em várias espécies animais. A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo amplificar quantidades mínimas do DNA do micro-organismo em diversos tipos de amostras biológicas tais como humor aquoso (Mérien et al., 1992), urina (Bal et al., 1994), soro sanguíneo (Brown et al., 1995), líquido (Romero et al., 1998) e tecidos (Brown et al., 2003). Entre as limitações destaca-se a incapacidade de determinar o sorovar envolvido, porém este dado apresenta maior valor epidemiológico do que propriamente diagnóstico (Levett, 2004).

Outro inconveniente é que a sensibilidade da PCR pode variar de acordo com os primers utilizados, a padronização dos reagentes, do protocolo de amplificação, seleção do material biológico, forma de conservação e tempo de estocagem da amostra, uma vez que o DNA pode ser facilmente degradado (Velose et al., 2000).

Diferentes estudos apresentam pares de primers com sensibilidade e especificidade variadas (Mérien et al., 1992; Gravekamp et al., 1993; Kee et al., 1994; Faber et al., 2000; Branger et al., 2005; Palaniappan et al., 2005; Jouglard et al., 2006; Reitstetter et al., 2006).

Os *primers* mais utilizados até o momento são os "A" e "B", descritos por Merien *et al* (Merien et al., 1992) que amplificam uma região de 331 pb do gene 16S rDNA, tanto de leptospiros patogênicos quanto saprófitas.

Palaniappan et al. (2005) desenvolveram o par de primers Lig1 e Lig2 que amplificam um fragmento de 468 pb da região amino-terminal dos genes ligA e ligB. O gene 1 lig é um fator de virulência encontrado apenas em leptospiros patogênicos (Palaniappan et al., 2002). Quando comparado com os primers previamente descritos, os primers Lig1 e Lig2 apresentaram-se mais sensíveis que os demais, amplificando menores quantidades de DNA por amostra e não detectando a forma apatógena do agente. Entretanto, os autores só avaliaram os primers desenhados com sorovares da espécie genômica *L. interrogans*. Outro estudo com diferentes espécies genômicas patogênicas de *Leptospira* spp, verificou que nem todas as espécies patogênicas possuem o gene lig completo, o que pode influenciar a sua detecção por primers específicos para este gene (Cerqueira, 2006).

Os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Jouglard et al. (2006), amplificam pela nested-PCR um fragmento altamente conservado de DNA que codifica a lipoproteína LipL32, considerada a principal lipoproteína da membrana externa de leptospiros patogênicos e importante fator de virulência, que está ausente em espécies não-patógenicas. A nested-PCR apresenta ótima sensibilidade e foi testada frente a diferentes espécies genômicas, diferentemente do estudo de Palaniappan et al. (2005).

A necessidade em identificar e caracterizar isolados de leptospiros, fez com que outros métodos moleculares fossem desenvolvidos. Métodos como, eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) (Herrmann et al., 1992; Gerritsen et al., 1995; Vinetz et al., 1996; Romero et al., 1998), uso de sondas de DNA (Zuerner & Bolin, 1990; Van Eys et al., 1991) e, mais recentemente, a análise por repetição em tandem de número variável (Majed et al., 2005; Slack et al., 2005). Os métodos moleculares têm provado serem de grande valor na caracterização de estirpes de

*Leptospira* (Turk et al., 2003), no entanto, precisam ser aprimorados na busca por técnicas mais precisas e rápidas para a tipificação.

Desta forma, o desenvolvimento de métodos diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos, que sejam baseados na detecção de todas as leptospiras patogênicas ou na identificação de anticorpos gerados contra antígenos presentes e conservados entre todas estas espécies é necessário.

A proteômica é considerada importante ferramenta para a identificação de alvos para uso em diagnóstico e vacinas (Thongboonkerd, 2008). Nesta perspectiva, as proteínas presentes exclusivamente em cepas patogênicas (Haake et al., 1993; Shang; Summers; Haake, 1996; Haake et al., 1998; Haake et al., 1999; Haake et al., 2000; Haake & Matsunaga, 2002; Cullen et al., 2003) são importantes alvos para o desenvolvimento de testes diagnósticos, seja utilizando métodos imunoquímicos ou moleculares. Entre estas proteínas, as localizadas na membrana externa (OMPs) de leptospiras patogênicas constituem alvo promissor para melhorar o diagnóstico laboratorial da leptospirose. Uma família de proteínas denominadas *immunoglobulin-like* (Ligs) foi descrita (Palaniappan et al., 2002) e seu potencial diagnóstico deve-se às características de localização na membrana externa, presença exclusiva em sorovares de leptospiras patogênicas e de serem expressas somente durante a infecção do hospedeiro (Matsunaga et al., 2003). Estas características têm sido avaliadas para o desenvolvimento de métodos moleculares ou imunológicos de diagnóstico na fase inicial da doença (Palaniappan et al., 2004; Palaniappan et al., 2005; Croda et al., 2007).

## Controle e Prevenção

As principais recomendações para o controle da leptospirose bovina estão relacionadas à identificação dos sorovares prevalentes na propriedade, a detecção da fonte de infecção, assim como os animais possivelmente infectados, imunoprofilaxia e antibioticoterapia nos animais portadores e enfermos. O controle sanitário dos animais incorporados aos rebanhos, o saneamento do ambiente favorável a sobrevivência das leptospiras e o controle de roedores também são considerados de grande importância para o controle e prevenção da enfermidade (Faine, 1982; Ellis, 1984; Lilenbaum, 1996).

Em infecções acidentais, determinadas por sorovares não mantidos pelos bovinos, deve-se identificar de que forma o rebanho está sendo exposto ao contato com os animais reservatórios de *Leptospira* spp. No entanto, quando a infecção é determinada pelo sorovar Hardjo, cuja principal fonte de infecção é o próprio bovino infectado, algumas

medidas devem ser praticadas simultaneamente, como: proibir a introdução de novos animais no rebanho, excetuando-se os animais negativos no sorodiagnóstico ou previamente tratados com antibioticoterapia, tratar os animais sororeagentes e fortalecer a imunidade utilizando vacinas que contenham sorovares presentes na região, incluindo se possível, estirpes locais.

A proteção específica dos animais suscetíveis é obtida com o uso de vacinas inativadas que contenham os sorovares de leptospiras presentes na região (Salles & Lilenbaum, 2000). A vacinação e a realização de testes sorológicos regulares são consideradas as medidas profiláticas eficazes no controle de novos surtos da enfermidade (Riet-Correa et al., 2001).

## Vacinas

Para a espécie bovina, as vacinas disponíveis comercialmente para o controle da leptospirose são baseadas na célula inteira inativada ou em preparados da membrana de leptospiras patogênicas. Apresentam imunidade restrita, necessitando repetir a vacinação para a manutenção da imunidade. Estes tipos de vacinas conferem resposta protetora através da indução de anticorpos contra o LPS destas bactérias e portanto restrita a sorovares antigenicamente relacionados. Existe um grande número de sorovares patogênicos (>250), o que impõe maior limitação para a produção de vacinas com componentes multi-sorovar (Gamberini et al., 2005).

A vacina contra a leptospirose deve ser formulada para uso em uma espécie animal em particular e em uma região geográfica particular. Esta deve conter somente sorovares que causam problemas na espécie animal ou que são transmitidas de uma espécie animal a outra na região (OIE, 2006).

As bacterinas anti-*Leptospira* spp de uso animal são controladas segundo protocolos internacionais que incluem testes de inocuidade e de potência (Bey; Johnson, 1986), no entanto os animais vacinados adquirem proteção contra a doença, mas não contra a infecção e podem eliminar leptospiras via urina (Bolin, 2003). Existe o consenso de que a proteção induzida é sorovar específica (Prescott et al., 1991), no entanto tem sido investigada a proteção cruzada entre representantes de um mesmo sorogrupo (Tabata et al., 2002).

Atualmente, em diversos laboratórios, os esforços estão concentrados no desenvolvimento de vacinas produzidas a partir de antígenos comuns a diversos sorovares ou que possam apresentar proteção cruzada contra estes (Haake et al., 1999) e que ainda induzam a proteção prolongada contra a grande diversidade de *Leptospira* spp. Neste sentido, proteínas

de membrana externa de *Leptospira* têm sido os maiores alvos para o desenvolvimento da vacina.

As OMPs (*outer membrane proteins* - proteínas de membrana externa), expostas na superfície das leptospiros, são consideradas como potenciais imunógenos. Dois tipos de OMPs foram caracterizados; as porinas, que são OMPs transmembrana e as lipoproteínas que estão ancoradas no espaço extracelular ou periplasmático da OM por ácidos graxos covalentemente ligados a uma cisteína amino-terminal (Zuerner et al., 2000).

Uma nova família de proteínas (Ligs) foi descrita (Palaniappan et al., 2002). Dados preliminares indicam seu potencial no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose, pois são proteínas de membrana externa presentes em todos os sorovares de leptospiros patogênicos e a expressão destas proteínas ocorre somente durante a infecção (Matsunaga et al., 2003; Koizumi & Watanabe, 2005).

Lipoproteínas de espiroquetas têm sido consideradas antígenos capazes de induzir resposta imune protetora (Haake, 2000), confirmando a sua importância na patogênese das leptospiros. Nestes micro-organismos, as lipoproteínas são, comprovadamente, as mais importantes proteínas que compõem a membrana celular. Entretanto, o número de lipoproteínas de superfície celular de *Leptospira* caracterizadas ainda é pequeno (Shang; Summers; Haake, 1996; Haake et al., 1998; Haake et al., 2000; Cullen et al., 2003). Estas lipoproteínas foram assim denominadas, com base em sua aparente massa molecular, de acordo com os critérios adotados para a nomenclatura das proteínas de *Treponema* (Norris, 1993). Por exemplo, a primeira lipoproteína de leptospira que foi nomeada de acordo com esta nomenclatura foi LipL41, por sua aparente massa molecular de 41 kDa.

Estudos de caracterização da proteína LipL41 demonstraram que esta encontra-se exposta na superfície bacteriana de organismos intactos e é altamente conservada entre leptospiros patogênicos, sendo expressa durante a infecção (Shang; Summers; Haake, 1996), assim como a LipL21 (Cullen et al., 2003).

A proteína LipL36, descrita por Haake e colaboradores (1998), é uma proteína expressa durante o crescimento *in vitro*, mas que *in vivo* possui níveis de expressão diminuídos, o que foi comprovado durante a infecção em mamíferos. Estudos experimentais em hamsters também demonstraram não haver produção de anticorpos protetores específicos contra esta proteína (Barnett et al., 1999), o que talvez seja devido ao fato da LipL36 estar ancorada na parte interna da OM não sendo, portanto, considerada uma proteína exposta (Shang; Summers; Haake, 1996; Haake, 2000; Zuerner et al., 2000).

A LipL45 foi descrita como uma proteína associada à virulência da *Leptospira* spp, pois é detectada somente em culturas de baixa passagem, não sendo expressa em cultivos atenuados. Esta proteína é expressa durante a infecção (Matsunaga et al., 2002).

A proteína LipL48 foi caracterizada como componente da OM de *Leptospira* (Haake; Matsunaga, 2002), no entanto, ela não foi identificada como componente do subconjunto de OMPs expostas na superfície da bactéria (Cullen et al., 2003). Isto sugere que esta proteína está localizada na porção interna da OM, como a LipL36 (Haake et al., 1998) e a LipL31, que também são descritas como pertencentes à membrana interna das leptospiras (Haake; Matsunaga, 2002).

Até o momento, a principal proteína de membrana de leptospira reportada é a LipL32. Vários trabalhos têm sido publicados indicando a proteína LipL32 como forte candidata para o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose. A sequência e a expressão de LipL32 são altamente conservadas entre espécies de leptospiras patogênicas e está ausente na membrana externa de leptospiras não patogênicas (Haake et al., 2000)

## Referências

ARAGÃO, H.B. Sobre a presença da *Espiroqueta icterohaemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro. Brasil-Médico, v.31, p 329-330, 1917

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. Leptospira and Leptospirosis. Veterinary Microbiology, v.140, p.287-296, 2010.

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

BAL, AE.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERT, RA.; DE MEZA BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, WJ. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology, v.32, p. 1894-1898, 1994.

BEY, R.F.; JOHNSON, R.C. Current status of leptospiras vaccines. Progress in Veterinary Microbiology and Immunology, v 2, p. 175-197, 1986.

BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; SUMMERS, T. A.; WAGAR, E. A.; CHEVILLE, N. F.; HARTSKEERL, R. A.; HAAKE, D. A. Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components During Renal Infection of Hamsters. Infection and Immunity, v.67, p. 853-861, 1999.

BASKERVILE, A. Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis. In: ELLIS, W.A.; LITTLE, T.W.A. (eds). The present state of leptospirosis diagnosis and control. Northern Ireland: [sn], p. 33-43, 1986.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)*, v.11, p.166-171, 1996.

BOLIN, C.A.; ALT, D.P. Clinical signs, diagnosis and prevention of bovine leptospirosis. *Bovine Practitioner, Stillwater*, v.33, n.1, p.50-55, 1999.

BOLIN, C.A. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> Western Dairy Management Conference*. Reno, N.V-155, 2003.

BRANGER, C.; BLANCHARD, B.; FILLONNEAU, C.; SUARD, I.; AVIAT, F.; CHEVALLIER, B.; ANDRE-FONTAINE, G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS. Microbiology Letters*, v. 243, p.437-445, 2005.

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

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

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49 n.2, p.839-858, 1999.

BROWN, PD.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, DG.; VAN DE KEMP, H.; HARTSKEERL, RA.; EDWARDS, CN.; EVERARD COR; TERPSTRA, WJ.; LEVETT, PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, p.110-114, 1995.

BROWN, PD.; CARRINGTON, DG.; GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; EDWARDS, CN.; JONES, SR.; PRUSSIA, PR.; GARRIQUES, S.; TERPSTRA, WJ.; LEVETT, PN. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Research in Microbiology*, v.154, p.581-586, 2003.

CARVALHAL, M.L.; ALTERTHUM, F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHAUM, F.; GOMPERTZ, O.F. *Microbiologia*. São Paulo: Ateneu, cap.2, p.09-23, 2002.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S.S.; GOTTI, T.B.; BATISTA, C.S.A.; GENTILI, J.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; VASCONCELLOS, S.A.; GENOVEZ, M.E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v75, n.1, p.3-11, 2008.

CERQUEIRA, G.M. Caracterização de *Leptospira* spp. quanto à presença e conservação dos genes da família lig: alvos potenciais para utilização em vacina e testes de diagnóstico. Pelotas, 2006. Dissertação, Mestrado em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, 52p, 2006.

CRODA, J.; RAMOS, J. G.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a

serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.5, p.1528-1534, 2007.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infection and Immunity*, v.71, n.5, p.2414-2421, 2003.

DA SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; CAMARGO, E. D.; BATISTA, L.; VAZ, A. J.; ROMERO, E. C.; BRANDAO, A. P. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.56, n.6, p.650-655, 1997.

DE LANGE, J.F.; GUMMOW, B.; TURNER, G.V.; REDMAN, A.R. The isolation of *Leptospira interrogans* serovar Pomona and related serological findings associated with a mixed farming unit in the Transvaal. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 54, p. 119-121, 1987.

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

ELLIS, W.A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Preventive Veterinary Medicine*, v.2, p.411-421, 1984.

ELLIS, W.A.; O'BRIEN, J.J.; CASSELLS, J.A.; NEILL, S.D.; HANNA, J. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo following calving or abortion. *Research Veterinary Science*, v.39, p. 296-298, 1985.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.10, p.463-478, 1994.

FABER, NA.; CRAWFORD, M.; LEFEBVRE, LB.; BUYUKMIHCI, NS.; MADIGAN, JE.; WILLITS, NH. Detection of *Leptospira* spp in the aqueous humor of horses with naturally acquires recurrente uveitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.2731-2733, 2000.

FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization Offset Publication[67]. Geneva. 1982.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. 2th ed. Medical Science, Melbourne, Australia, 272p, 1999.

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

FEIGIN, R. D.; ANDERSON, D. C. Human leptospirosis. *CRC Critical Review in Clinical Laboratory Sciences*, v.5, p.413-467, 1975.

FERESU, S.B.; ANN, B.C.; VAN DE, K.H.; KORVER, H. Identification of a serogroup bataviae *Leptospira* strain isolated from an ox in Zimbabwe. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 289:19-29, 1999.

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

FONSECA, F.; PRADO, A. *Revista de Medicina Cirúrgica do Brasil*, v.40, n.65, 1932.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-Genome Analysis of *Leptospira Interrogans* to Identify Potential Vaccine Candidates Against Leptospirosis. *FEMS Microbiological Letters*, v.244, p.305-313, 2005.

GERRITSEN, M. A.; SMITS, M.A.; OLYHOEK, T. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for rapid identification of leptospiras of serogroup Sejroe. *Journal of Medical Microbiology*, v.42, p.336-339, 1995.

GRAVEKAMP, C.; VAN DE, K.H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G. J.; VAN EYS, G.J.; EVERARD, C.O.; HARTSKEERL, R.A.; TERPSTRA. W.J. Detection of seven species of pathogenic leptospiras by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology*, v.139, p.1691-1700, 1993.

GUIMARÃES, M.C.; CÔRTEZ, J.A.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e o seu controle terapêutico. *Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo*, v.6-7, n.1-4, p.21-34, 1982-1983.

GUSSENHOVEN, G. C.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A.; MOL, B. W.; VAN INGEN, C. W.; SMITS, H. L. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.1, p.92-97, 1997.

HAAKE, D. A.; CHAMPION, C. I.; MARTINICH, C.; SHANG, E. S.; BLANCO, D. R.; MILLER, J. N.; LOVETT, M. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *Journal of Bacteriology*, v.175, n.13, p.4225-4234, 1993.

HAAKE, D. A.; MARTINICH, C.; SUMMERS, T. A.; SHANG, E. S.; PRUETZ, J. D.; MCCOY, A. M.; MAZEL, M. K.; BOLIN, C. A. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infection and Immunity*, v.66, n.4, p.1579-1587, 1998.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infection and Immunity*, v.67, n.12, p.6572-6582, 1999.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*, v.146, p.1491-1504, 2000.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer

membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity*, v.68, n.4, p.2276-2285, 2000.

HAAKE, D.A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infection and Immunity*, v.70, p.4936-4945, 2002.

HASHIMOTO, V.Y.; GARCIA, J.L.; SPOHR, K.A.H.; SILVA, F.G.; ALVES, L.S.; FREITAS, J.C. Prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos, caninos, eqüinos, ovinos e suínos do município de Jaguapita, estado do Paraná, Brasil. *Arquivos do instituto Biológico*, v.77, n.3, p.521-524, 2010.

HATHAWAY, S.C.; LITTLE, T.W.A.; PRITCHARD, D.G. Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection in bovine populations. *Veterinary Record*, v.26, p.85-86, 1986.

HEALTH, S.E.; JOHNSON, R. Leptospirosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 205, p.1518-1523, 1994.

HERRMANN, J. L.; BELLENGER, E.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT, G.I. Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.1696-1702, 1992.

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

JOUGLARD, S.D.; SIMIONATTO, S.; SEIXAS, F.K.; NASSI, F.L.; DELLAGOSTIN, A.O. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Canadian Journal of Microbiology*, v.52, p.747-752, 2006.

KEE, S.H.; KIM, I.S.; CHOI, M.S.; CHANG, W.H. Detection of leptospiral DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.1035-1039, 1994.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present, and Future. *Journal of Postgraduate Medical*, v.51, p.210-214, 2005.

LANGONI, H. Leptospirosis: aspectos de saúde animal e de saúde pública. *Revista de Educação Continuada do CRMV, São Paulo*, v.2, n.1, p.52-58, 1999.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? *Journal of Medical Microbiology*, v.48, p.417-418, 1999.

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

LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.66, n.6, p.745-748, 2002.

LEVETT, P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v.6, p.435-448, 2004.

- LILENBAUM, W.; SANTOS, M.R.C. Leptospirosis in animal reproduction: III. Role of the Hardjo serovar in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v.37, n.2, p.87-92, 1995.
- MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. (2005) Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 539-545, 2005.
- MATSUNAGA, J.; YOUNG, T. A.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; HAAKE, D. A. Novel 45-Kilodalton Leptospiral Protein That Is Processed to a 31-Kilodalton Growth-Phase-Regulated Peripheral Membrane Protein. *Infection and Immunity*, v.70, p.323-334, 2002.
- MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*, v.49, n.4, p.929-945, 2003.
- MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.18, n.5, p.376-386, 2005.
- MCCLINTOCK, C.S.; MCGOWAN, M.R.; CORNEY, B.G.; COLLEY, J.; SMYTHE, L.; DOHNT, M.; WOODROW, M. Isolation of *Leptospira interrogans* serovars Hardjo and Zanon from a dairy herd in north Queensland. *Australian Veterinary Journal*, v.70, n.10, p. 393-394, 1993.
- MCDOWEL, A. "Do icterus epidemicus". *Arquivos Brasileiros de Medicina*, v.7, 635-645, 1917.
- MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.2219-2224, 1992.
- 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, p.1761-1768, 1991.
- MOREIRA, E.C. Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 93p, 1994.
- MYYERS, D.M. Manual de métodos para El diagnóstico de laboratorio de La leptospirosis. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.
- NORONHA DE MIRANDA, R. *Revista de Medicina do Paraná*, v.15, n.6, p.229, 1946.
- NORRIS, S. J. Polypeptides of *Treponema pallidum* : progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group. *Microbiology Review*, v.57, p.750-779, 1993.
- OIE. 2006. World organization for animal health. Leptospirosis. Chapter 2.2.4. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/manual/A\\_00043.htm](http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00043.htm)>. Acessado em: 08/01/2007.

OLIVEIRA, A.A.; MOTA, R.A.; PEREIRA, G.C.; LANGONI, H.; SOUZA, M.I.; NAVEGANTES, W.A.; SÁ, M.E. Soroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns municipal district, Pernambuco state, Brazil. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.68, n.4, p. 275279, 2001.

OLIVEIRA, F.C.S.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO, S.R.; VIEGAS, S.A.R.A.; BATISTA, C.S.A.; COELHO, C.P.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; GONÇALES, A.P.; ALMEIDA, C.A.S.; VASCONCELLOS, S.A. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.76, n.4, p.539-546, 2009.

OLIVEIRA, F.C.S.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO, S.R.; VIEGAS, S.A.R.A.; BATISTA, C.S.A.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; GONÇALES, A.P.; ALMEIDA C.A.S.; VASCONCELLOS, S.A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.5, p.398-402, 2010.

PALANIAPPAN, R.U.; CHANG, Y.F.; JUSUF, S.S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J.F.; MCDONOUGH, S.P.; BARR, S.C.; DIVERS, T.J.; SIMPSON, K.W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H.O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity*, v.70, p.5924-5930, 2002.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; HASSAN, F.; MCDONOUGH, S. P.; POUGH, M.; BARR, S. C.; SIMPSON, K. W.; MOHAMMED, H. O.; SHIN, S.; MCDONOUGH, P.; ZUERNER, R. L.; QU, J.; ROE, B. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *Journal of Medical Microbiology*, v.53, n.10, p.975-984, 2004.

PALANIAPPAN, R.U.; CHANG, Y.F.; CHANG, C.F.; PAN, M.J.; YANG, C.W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S.P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROED, B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Molecular and Cellular Probes*, v.19, p.111-117, 2005.

PETCHCLAI, B.; HIRANRAS, S.; POTHA, U. Gold immunoblot analysis of IgM specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.45, n.6, p.672-675, 1991.

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*, v.52, p.210-215, 1988.

PRESCOTT, J.F.; FERRIER, R.L.; NICHOLSON V.M.; JOHNSTON K.M.; HOFF B. Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.32, p.481-86, 1991.

QUINN, P.J. ; CARTER. M.E.; MARKEY, B.K. *Clinical Veterinary Microbiology*. London, Wolfe, 648p, 1994.

REITSTETTER, RE. Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. *Microbiology Letters*, v.264, p.31-39, 2006.

RIET-CORREA, F.; LEMOS, R.A.A. Leptospirose. In: RIET-CORREA, F. et al. Doenças de ruminantes e equinos. 2ed. São Paulo: Varela, v.1, p.275-284, 2001.

ROMERO, E.C.; BILLERBECK, A.E.; LANDO, V.S.; CAMARGO, E.D.; SOUZA, C.C.; YASUDA P. H. Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 36, 1453-1455, 1998.

RIBEIRO, M.A.; SOUZA, C.C.; ALMEIDA, S.H. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. Journal of Tropical Medical and Hygiene, v.98, n.6, p.452-456, 1995.

SALLES, R.S.; LILENBAUM, W. Leptospirose bovina no Brasil. Revista CFMV: suplemento técnico, v.20, 2000.

SEFTON, B. Brasileiro de Medicina, v. 52; n.16, p.379, 1938.

SHANG, E.S.; SUMMERS, T.A.; HAAKE, D.A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infection and Immunity, v.64, n.6, p.2322-2330, 1996.

SLACK, A.T.; DOHNT, M.F.; SYMONDS, M.L.; SMYTHE, L.D. Development of a Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, v.4, p.1-10, 2005.

SMILLIE, W.G.. Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia, v.12, p.182, 1921.

TABATA, R.; SCANAVINI NETO, H.; ZUANAZE, M.A.F.; OLIVEIRA, E.M.D.; DIAS, R.A.; MORAIS, Z.M.; ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup Sejroe. Brazilian Journal of Microbiology, v.33, p.267-270, 2002.

TERPSTRA, W. J.; SCHOONE, G. J.; TER, S. J. Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridisation with <sup>32</sup>P- and biotin-labelled probes. Journal of Medical Microbiology, v.22, n.1, p.23-28, 1986.

TERPSTRA, W. J.; SCHOONE, G. J.; LIGTHART, G. S.; TER SCHEGGET, J. Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by in situ hybridization using biotin-labelled DNA probes. Journal of General Microbiology, v.133, p.911-914, 1987.

THONGBOONKERD, V. Proteomics in leptospirosis research: towards molecular diagnostics and vaccine development. Expert Review of Molecular Diagnosis, v.8, n.1, p.53-61, 2008.

TURK, N.; MILAS, Z.; MARGALETIC, J.; STARESINA, V.; SLAVICA, A.; RIQUELME-SERTOUR, N.; BELLENGER, E.; BARANTON, G.; POSTIC D. Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. Epidemiology and Infection, v.130, p.159-166, 2003.

VAN EYS, G.J.; GERRITSEN, M.J.; KORVER H.; SCHOONE, G.J.; KROON, C.C.; TERPSTRA, W.J. Characterization of serovars of the genus *Leptospira* by DNA

hybridization with hardjobovis and icterohaemorrhagiae recombinant probes with special attention to serogroup sejroe. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, p.1042-1048, 1991.

VELOSE, I.F.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E.; MOREIRA, EC. A comparison of three DNA extractive procedure with *Leptospira* for Polymerase Chain Reaction analysis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, p.339-343, 2000.

VINETZ, J.M.; GLASS, G.E.; FLEXNER, C.E.; MUELLER, P.; KASLOW, DC. Sporadic urban leptospirosis. *Annals of Internal Medicine*, v.125, p.794-798, 1996.

YAN, K. T.; ELLIS, W. A.; MACKIE, D. P.; TAYLOR, M. J.; MCDOWELL, S. W.; MONTGOMERY, J. M. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.69, n.3, p.173-187, 1999.

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

ZACARIAS, F.G.S.; VASCONCELLOS, S.A.; ANZAI, E.K.; GIRALDI, N.; FREITAS, J.C.; HARTSKEERL. Isolation of leptospira serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n.4, 2008.

ZUERNER, R.L.; BOLIN, C.A. Nucleic acid probe characterizes *Leptospira interrogans* serovars by restriction fragment length polymorphisms. *Veterinary Microbiology*, v.24, p. 355-366, 1990.

ZUERNER, R.; HAAKE, D.; ADLER, B.; SEGERS, R. Technological Advances in the Molecular Biology of *Leptospira*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v.2, p.455-462, 2000.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a epidemiologia da leptospirose em rebanhos bovinos com atividade reprodutiva do estado do Paraná.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de rebanhos e animais sororeagentes à *Leptospira* spp nos circuitos produtores e estado do Paraná.
- Identificar os fatores de risco associados à infecção pela *Leptospira* spp e sorovar Hardjo no estado do Paraná.
- Realizar o acompanhamento sorológico e molecular e isolar *Leptospira* spp em amostras de urina de fêmeas bovinas, naturalmente infectadas, de rebanho de leite localizado na região norte do estado do Paraná.
- Avaliar a distribuição espacial da *Leptospira* spp em rebanhos bovinos do estado do Paraná.

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### 3.1 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE BOVINA NO ESTADO DO PARANÁ<sup>1</sup>

Trabalho.....

Situação epidemiológica da leptospirose bovina no estado do Paraná

#### **ABSTRACT - [Epidemiological situation of bovine leptospirosis in the state of Paraná.]**

Situação epidemiológica da leptospirose bovina no estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid 380, Cx. Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brazil. E-mail:freitasj@uel.br

**ABSTRACT.-** The aim of this study was to determine the prevalence of leptospirosis and their spatial distribution, as well as to identify the risk factors for this disease in breeding cattle herds with reproductive activity in the Paraná state. In this study, the state was stratified into seven producer circuits. The statistic delineation, the serum samples and information regarding of the selected farms, were the same employed in the study of bovine brucellosis for Paraná state in the context of National Program for Control and Eradication of Brucellosis and tuberculosis (PNCEBT). A total of 14.163 females aged >24 months from 1.926 herds not vaccinated against leptospirosis were studied. Serum samples were tested for antibodies against *Leptospira* spp using microscopic agglutination test (MAT) with 22 serovars. The information required for geoprocessing were obtained during visits to farms, which were applied in epidemiological surveys to obtain epidemiological information and management practices employed and performed the collection of blood samples. The program ArcGIS9 was utilized to construct the final risk map, defining the areas of greatest epidemiological risk of the disease in the state. The prevalence of infected herds and animal in Paraná state were 54.28% [52.05-56.51] and 37,70% [34.54-40.86], respectively. Rent of pastures (O.R=1.91; I.C=1.36-2.68), presence of equine (O.R=1.59; I.C=1.28-1.97), presence of > 20 females > 24 months (O.R=2.25; I.C=1.46-3.49), presence of > 49 bovines (O.R=2.78; I.C=1.82-4.27), animal purchase (O.R=1.96; I.C=1.59-2.41) and presence of maternity paddock (O.R=1.32; I.C=1.04-1.68) were identified as risk factors for leptospirosis due to any serovar in the multivariate logistic regression. Risk factors for leptospirosis due to serovar Hardjo were presence of > 49 bovines (O.R=3.05; I.C=1.94-4.80), presence of > 20 females > 24 months (O.R=2.38; I.C=1.50-3.79), presence of equine (O.R=1.87; I.C=1.45-2.42), animal purchase (O.R=2.14; I.C=1.68-2.72) and rent of pastures (O.R=2.22; I.C=1.54-3.21). The spatial visualization of the reagents herds in MAT identified the regions northwest/north and southwest as the areas of greatest risk and occurrence of the disease in the state. The analysis of the prevalence of herds and animals showed that *Leptospira* spp is present in all seven producers circuits that the state was divided, being possible to identify the areas of greatest risk and occurrence of the disease in the herds studied. The results of analysis of risk factors indicate that characteristics of the properties and management are associated with

<sup>1</sup> Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico **Pesquisa Veterinária Brasileira**, disponível em <http://www.pvb.com.br/>

seropositivity for *Leptospira* spp and should be considered in programs to prevent the disease. Thus, epidemiological results obtained in this study may assist in developing strategies to control, especially in the areas of greatest risk and occurrence of leptospirosis, producing better results in reducing the incidence of the disease.

**INDEX TERMS:** Prevalence. Epidemiology. Risk factors. Spatial distribution. Leptospirosis. Microscopic agglutination test.

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp, sua distribuição espacial e os fatores de risco associados à infecção nos rebanhos bovinos com atividade reprodutiva do estado do Paraná. Neste estudo, o estado foi estratificado em sete circuitos produtores. O delineamento estatístico, as amostras sorológicas e as informações referentes às propriedades foram as utilizadas no estudo da brucelose bovina no estado do Paraná dentro do contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Foram estudadas 14.163 fêmeas com idade > 24 meses, provenientes de 1.926 rebanhos não vacinados contra a leptospirose. Para o diagnóstico sorológico da infecção foi utilizada a prova de soroglutinação microscópica (SAM) com 22 sorovares de *Leptospira* spp. As informações necessárias para o geoprocessamento foram obtidas durante as visitas as propriedades rurais, nas quais foram aplicados os questionários epidemiológicos para a obtenção de informações epidemiológicas e práticas de manejo empregadas. O programa ArcGIS9 foi utilizado para a confecção do mapa de risco final, definindo as áreas de maior risco epidemiológico da enfermidade no estado. A prevalência de focos e animais no estado foi de 54,28% [52,05-56,51] e 37,70% [34,54-40,86], respectivamente. Foram identificados como fatores de risco para a infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp na análise de regressão logística multivariada: aluguel de pasto (O.R=1,91; I.C=1,36-2,68); presença de equinos (O.R=1,59; I.C=1,28-1,97); presença de > 20 fêmeas com idade > 24 meses (O.R=2,25; I.C=1,46-3,49); presença de > 49 bovinos (O.R=2,78; I.C=1,82-4,26); compra de reprodutores (O.R=1,96; I.C=1,59-2,41), presença de piquete de parição (O.R=1,32; I.C=1,04-1,68). Os fatores de risco para a infecção pelo sorovar Hardjo foram presença de > 49 bovinos (O.R=3,05; I.C=1,94-4,80), presença de > 20 fêmeas com idade > 24 meses (O.R=2,38; I.C=1,50-3,79); presença de equinos (O.R=1,87; I.C=1,45-2,43); compra de reprodutores (O.R=2,14; I.C=1,68-2,72) e aluguel de pasto (O.R=2,22; I.C=1,54-3,21). A visualização espacial dos rebanhos sororeagentes na SAM permitiu identificar as regiões norte/noroeste e sudoeste como as áreas de maior ocorrência e risco da enfermidade no estado. A análise de prevalência de focos e de animais demonstrou que a *Leptospira* spp está presente em todos os sete circuitos produtores em que o estado do Paraná foi dividido, sendo possível identificar as áreas de maior risco e de ocorrência da enfermidade nos rebanhos bovinos estudados. O resultado da análise dos fatores de risco indica que as características das propriedades e fatores relacionados ao manejo estão associados a soropositividade para a *Leptospira* spp e devem ser considerados em programas de prevenção da doença. Desta forma, os dados epidemiológicos obtidos neste estudo poderão auxiliar na elaboração de estratégias de controle, principalmente nas áreas de maior risco e ocorrência da leptospirose, produzindo melhor resultado na redução da incidência da doença.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Prevalência. Epidemiologia. Fator de risco. Distribuição espacial. Leptospirose. Soroglutinação microscópica.

### 3.1.1 Introdução

Dentre as enfermidades que envolvem a esfera reprodutiva, a leptospirose é considerada uma das mais importantes no Brasil, comprometendo os níveis de produção e produtividade dos rebanhos bovinos afetados (Brasil 1995). As perdas econômicas causadas pela leptospirose bovina estão direta ou indiretamente relacionadas a falhas reprodutivas, abortos, aos custos com assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais. Os problemas reprodutivos são as principais manifestações clínicas da leptospirose em bovinos sendo, frequentemente, os únicos sinais observados no rebanho (Faine et al. 1999).

Nas criações de bovinos, a disseminação e a manutenção da leptospirose são caracterizadas principalmente pela presença de animais infectados ou portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina, descargas cérvico-vaginais, fetos abortados e placenta (Faine et al. 1999). Outros fatores como a existência de sorovares de leptospiras na região, a criação simultânea de animais de diversas espécies, a presença de animais silvestres, as condições ambientais e climáticas, do manejo, entre outros, também podem influenciar o contato do bovino com o micro-organismo (Ellis 1984).

Levantamentos sorológicos realizados em grande parte do país revelam a presença e alta frequência da leptospirose nos rebanhos bovinos estudados (Favero et al. 2002, Genovez et al. 2004, Castro et al. 2008, Figueiredo et al. 2009, Hashimoto et al. 2010). No estado do Paraná, os estudos já realizados sobre a leptospirose bovina se restringiram a determinadas regiões, não sendo possível estabelecer o real impacto e frequência desta doença para o estado. Desta forma, estudos abrangentes são de grande valor, com o objetivo de esclarecer a situação epidemiológica da enfermidade no estado.

Considerando a escassez de informações epidemiológicas da leptospirose bovina no estado do Paraná, o objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp, sua distribuição espacial e os fatores de risco associados à infecção nos rebanhos bovinos com atividade reprodutiva do estado do Paraná.

### 3.1.2 Material e Métodos

#### 3.1.2.1 População estudada

O estudo foi realizado no estado do Paraná, localizado no sul do Brasil. O delineamento estatístico, as amostras sorológicas e as informações referentes às propriedades

foram as utilizadas no estudo da brucelose bovina no estado do Paraná, dentro do contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), proposto pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em colaboração com a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB-PR). Para o estudo, o estado foi dividido em sete circuitos produtores de bovinos, levando-se em consideração os diferentes sistemas de produção, práticas de manejo, finalidades de exploração, tamanho médio de rebanhos e sistemas de comercialização de cada região. Cada circuito estava integrado a diferentes núcleos de administração da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB-PR) (Fig.1). Os dados censitários tomados como base para os cálculos da amostra e das prevalências foram os mais atualizados e disponíveis à época do trabalho de campo (Paraná 2001). O quadro 1 apresenta o resumo dos dados censitários e também a amostragem estudada em cada um dos circuitos produtores.

### 3.1.2.2 Delineamento amostral.

Para estimar a prevalência de focos foi realizado um estudo amostral em dois estágios. No primeiro estágio sorteou-se aleatoriamente, um número pré-estabelecido de propriedades com atividade reprodutiva (unidades primárias de amostragem). Dentro das unidades primárias, foi amostrado, aleatoriamente, um número pré-estabelecido de fêmeas bovinas com idade > 24 meses (unidades secundárias), com a finalidade de determinar o estado sanitário do rebanho.

O número de rebanhos selecionados por circuito produtor foi determinado pelo grau de confiança do resultado, pelo nível de precisão desejado e pelo valor da prevalência esperado (Noordhuizen et al. 1997), utilizando-se a fórmula para amostras simples aleatórias, segundo Thrusfield (1995) e Noordhuizen et al. (1997):

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot \sqrt{P(1-P)}}{d^2}$$

Onde:

$n$  = número de propriedades amostradas por circuito produtor;

$Z_{\alpha}$  = valor da distribuição normal para o grau de confiança de 95%;

$P$  = prevalência esperada;

$d$  = precisão, fixada em 5%.

A seleção aleatória dos rebanhos foi realizada a partir de cadastro de propriedades existentes na SEAB-PR, considerando o número de propriedades existentes no município e número de propriedades amostradas no circuito produtor correspondente. Para cada município, as propriedades existentes foram numeradas e os dados armazenados em planilhas do programa Microsoft Excel 2000®.

O planejamento amostral para as unidades secundárias visou estimar o número mínimo de animais a serem examinados, dentro de cada propriedade, de forma a permitir a sua classificação como foco ou não foco.

O programa Herdacc®, *version 3* (University of Guelph) foi empregado para determinar o número de animais selecionados de cada rebanho, considerando o tamanho da população, prevalência intra-rebanho de 50%, sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico utilizado (SAM), de forma a obter sensibilidade e especificidade de rebanho superiores a 90%.

Em rebanhos constituídos por até 99 fêmeas, com idade > 24 meses, foram amostrados 10 animais ou todas as fêmeas nesta faixa etária em rebanhos com menos de 10 animais. Em rebanhos constituídos por mais de 99 fêmeas, foram amostradas 15 fêmeas (Paraná 2001). A seleção dos animais dentro da propriedade foi aleatória utilizando-se dois métodos, a amostragem aleatória simples ou a aleatória sistemática. Foram analisadas 14.163 fêmeas bovinas com idade > 24 meses, provenientes de 1.926 rebanhos não vacinados contra a leptospirose.

Foram analisadas 14.163 fêmeas com idade > 24 meses, provenientes de 1.926 rebanhos não vacinados contra a leptospirose.

### 3.1.2.3 Coleta das amostras de sangue e dados epidemiológicos

O trabalho de campo foi realizado por médicos veterinários e técnicos da SEAB-PR, no período de dezembro de 2001 a julho de 2002. Em cada propriedade visitada foi aplicado um questionário epidemiológico, que permitiu a caracterização das práticas de manejo empregadas, além do estudo de fatores de risco associados com a presença ou ausência da *Leptospira* spp. A coleta de sangue foi realizada por meio de punção da veia jugular utilizando agulha descartável estéril e tubo com vácuo, previamente identificados. As amostras de soro obtidas foram armazenadas em microtubos de plástico e congeladas a -20°C.

### 3.1.2.4 Teste sorológico para *Leptospira* spp

Para detectar anticorpos contra *Leptospira* spp, todos os soros foram submetidos à prova de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos (Faine et al. 1999). Foram utilizados 22 sorovares de referência: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcomb, Cynopteri, Fortbragg, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Sentot e Tarassovi. Os antígenos foram mantidos a 28°C por 5 a 10 dias em meio EMJH (DIFCO®-EUA). As amostras de soros que na SAM apresentaram pelo menos 50% das leptospiras aglutinadas na diluição de 1:100 foram consideradas reagentes e então diluídas geometricamente na razão dois para determinação da diluição máxima positiva.

No animal, o provável sorovar infectante foi o que apresentou o maior título. Com exceção da associação entre os sorovares Hardjo e Wolffi, os animais que apresentaram títulos mais elevados e idênticos para dois ou mais sorovares foram excluídos desta análise e considerados reagentes para a *Leptospira* spp.

Na propriedade, o provável sorovar infectante foi o que apresentou o maior título e o maior número de reações positivas. Uma propriedade foi considerada positiva (foco) quando apresentou pelo menos um animal sororeagente na propriedade.

### 3.1.2.5 Cálculos de Prevalências

O estudo amostral permitiu determinar as prevalências de focos e de fêmeas > 24 meses sororeagentes para a *Leptospira* spp no estado do Paraná e nos circuitos produtores. Os cálculos de prevalências e os respectivos intervalos de confiança foram realizados com o auxílio do programa EpiInfo 6.04d (Dean et al. 1994).

A prevalência aparente de focos de *Leptospira* spp foi calculada utilizando-se como parâmetros o número de focos e número de propriedades amostradas, considerando-se que a amostragem das unidades primárias em cada circuito produtor, foi aleatória sistemática (Cochran 1997).

No estado, devido a divisão em circuitos produtores, considerou-se que a amostragem de unidades primárias foi estratificada sistemática aleatória (Cochran, 1997). Os parâmetros utilizados no cálculo de prevalência aparente de focos foram o *status* da propriedade (foco ou livre de *Leptospira* spp), o circuito a que pertence cada propriedade e o peso estatístico de cada propriedade amostrada no circuito, calculado pela razão entre o

número de propriedades com atividade reprodutiva e o número de propriedades amostradas em cada circuito produtor (Dean et al., 1994).

A prevalência aparente de fêmeas > 24 meses sororeagentes também foi calculada para cada um dos circuitos produtores e para o estado. Neste caso, a escolha de unidades secundárias foi realizada por meio de uma amostra de agrupamentos estratificada (Cochran, 1997). Os parâmetros utilizados neste cálculo foram o *status* do animal (sororeagente ou negativo); o circuito ao qual pertence a propriedade da qual foi retirada cada amostra; a identificação da propriedade no estudo; e o peso estatístico de cada animal amostrado, calculado pela fórmula (Dean et al., 1994):

$$\text{Peso} = \frac{\text{fêmeas} > 24 \text{ meses no circuito produtor} \times \text{fêmeas} > 24 \text{ meses na propr.}}{\text{fêmeas} > 24 \text{ meses nas prop. amostradas} \times \text{fêmeas} > 24 \text{ meses amostradas na propr.}}$$

O primeiro fator desta fórmula representa quanto cada animal selecionado representa no circuito e o segundo quanto cada animal representa na propriedade.

### 3.1.2.6 Estudo dos fatores de risco

Para a identificação dos possíveis fatores de risco foi realizado um estudo do tipo transversal. Foram formados dois grupos de propriedades (focos e não focos) que, quando comparados entre si quanto às variáveis pesquisadas no questionário epidemiológico, permitiu medir a força de associação destas variáveis com a presença da *Leptospira* spp. As variáveis analisadas foram: tipo de criação; tipo de exploração; raça predominante; número total de bovinos existentes; número de fêmeas acima de 24 meses; presença de outras espécies domésticas; presença de espécies silvestres de vida livre; uso de inseminação artificial; destino de fetos e placentas; compra ou venda de machos e/ou fêmeas para reprodução; pastagens em comum com outras propriedades; prática de aluguel de pasto; piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto e ocorrência de aborto.

As categorias das variáveis foram organizadas de modo a apresentarem-se em escala crescente de risco (Latorre, 2004). Quando necessário, realizou-se a recategorização destas variáveis. A categoria de menor risco foi considerada como base para a comparação das demais categorias. As variáveis quantitativas foram recategorizadas em quartis.

A análise dos fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e multivariada. A análise univariada foi realizada para verificar a associação entre o *status* do rebanho para a *Leptospira* spp e sorovar Hardjo (ausência de animais sororeagentes =0; presença de um animal sororeagente =1) e variáveis de risco, utilizando o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher. As variáveis com valor de  $p < 0,2$  na análise univariada foram incluídas na análise de regressão logística multivariada (Hosmer & Lemeshow 1989). As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS *versión* 9.0 (SPSS INC 1999a).

### 3.1.2.7 Geoprocessamento

As informações necessárias para o geoprocessamento foram obtidas durante as visitas as propriedades rurais, nas quais foram preenchidos os questionários epidemiológicos e realizadas as coletas de amostras de sangue. As coordenadas geográficas (latitude e longitude) de cada propriedade foram obtidas por meio de aparelhos de posicionamento global por satélite (GPS- Global Position System), modelo Garmin 12XL<sup>3</sup>, que serviram para a criação de um banco de dados no programa Microsoft Excel 2000®. Posteriormente estes dados foram inseridos e analisados no programa ArcGIS 9, versão 9.3 (ERSI) para a confecção do mapa. A prevalência da leptospirose bovina nas propriedades amostradas foi o atributo selecionado no programa para a criação do mapa epidemiológico inicial. O mapa de risco final ou análise de Kernel foi gerado utilizando-se a ferramenta Spatial Analyst, função density, do ArcGis para definir as áreas de risco epidemiológico da doença. A margem de erro (d) foi calculada por meio da fórmula:

$$d = t [(N-n)/(N-1)] \cdot \frac{1}{2} [(P \times Q/n) \cdot \frac{1}{2}]$$

Onde:

t = Taxa constante usada no cálculo do erro (4,96)

N = Total de municípios

n = Municípios com casos positivos

P x Q = Probabilidade de eventos (2500)

### 3.1.3 Resultados

#### 3.1.3.1 Prevalência de *Leptospira* spp em animais e rebanhos

No quadro 2 estão apresentados os resultados de prevalência de animais sororeagentes na SAM para qualquer um dos 22 sorovares de *Leptospira* spp no estado e nos circuitos produtores. A prevalência de animais sororeagentes detectada para o estado foi de 37,70% [34,54-40,86]. Os circuitos produtores 2 e 4 apresentaram as maiores prevalências de animais sororeagentes com 47,29% [39,33-55,25] e 48,09% [41,29-54,89], respectivamente.

No quadro 3 estão descritos os resultados de prevalência de focos de leptospirose no estado e nos circuitos produtores. A prevalência de focos detectada para o estado foi de 54,28% [52,05-56,51]. Os circuitos produtores 1 e 2 apresentaram as maiores prevalências de focos com 77,74% [72,44-82,45] e 82,50% [77,53-86,76], respectivamente.

No quadro 4 estão demonstrados os resultados de prevalência de focos da doença por tipo de exploração zootécnica no estado e nos circuitos produtores. A maior prevalência de focos detectada para o estado foi em rebanhos especializados na pecuária de corte com 76,92% [72,06-81,31].

#### 3.1.3.2 Prevalência de sorovares de *Leptospira* spp

Nos quadros 5 e 6 estão demonstrados os sorovares prevalentes de *Leptospira* spp nos rebanhos e animais sororeagentes do estado do Paraná. O sorovar Hardjo foi considerado o mais provável, com títulos de anticorpos variando entre 100 a 3200.

#### 3.1.3.3 Análise dos fatores de risco

Os quadros 7 e 8 apresentam os resultados da análise univariada dos possíveis fatores de risco associados a infecção para qualquer um dos 22 sorovares de *Leptospira* spp utilizados e sorovar Hardjo, respectivamente, nos rebanhos do estado do Paraná.

Os fatores de risco associados à infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp e sorovar Hardjo identificados na análise de regressão logística multivariada estão descritos nos quadros 9 e 10, respectivamente.

#### 3.1.3.4 Geoprocessamento

A visualização espacial dos rebanhos sororeagentes na SAM permitiu identificar as regiões norte/noroeste e sudoeste como as áreas de maior ocorrência e risco da enfermidade no estado.

#### 3.1.4 Discussão

A utilização da SAM para a detecção de anticorpos *anti-Leptospira* spp em 14.163 soros de fêmeas bovinas em idade reprodutiva provenientes de 1.926 propriedades permitiu a visualização da leptospirose bovina no estado do Paraná. A análise de prevalência de focos e de animais demonstrou que a leptospirose está presente em todos os sete circuitos produtores em que o estado do Paraná foi dividido. Os rebanhos selecionados no presente trabalho não apresentavam histórico de vacinação contra a leptospirose, de forma que o resultado de prevalência de focos representa o contato natural com o micro-organismo, demonstrando a real situação epidemiológica no estado.

As regiões noroeste, centro-oeste/norte e centro-sul representadas pelos circuitos produtores 1, 2 e 4 apresentaram as maiores prevalências de focos e de animais (Quadros 2 e 3). No período estudado, estas regiões concentravam 60% do total de bovinos do estado e nelas encontravam-se as propriedades com maior número de animais. Vários estudos revelaram a associação entre o tamanho do rebanho e a presença da leptospirose (Castro et al., 2008; Oliveira et al., 2010). De acordo com Oliveira et al. (2010), rebanhos maiores ou com alta densidade de animais apresentam maiores probabilidades de infecção pela *Leptospira* spp. Entretanto, a prevalência da leptospirose em um rebanho, dependerá, sobretudo, da presença de animais portadores que eliminem o micro-organismo através da urina, da contaminação do meio ambiente com as leptospirosas vivas, da sobrevivência das mesmas no ambiente e do contato dos animais suscetíveis com o agente (Niang et al., 1994).

A análise de prevalência de focos por tipo de exploração zootécnica demonstrou que a *Leptospira* spp está presente em todos os tipos de exploração (Quadro 4). Entretanto, a prevalência de focos, entre os circuitos produtores e no estado, foi maior em rebanhos especializados na pecuária de corte. A elevada prevalência de focos detectada neste tipo de exploração pode ser atribuída à estrutura de produção do estado, o qual apresenta cerca de 70% dos seus rebanhos bovinos destinados a exploração de corte (Borges; Mezzadri, 2009).

A visualização espacial das propriedades reagentes a leptospirose na SAM (Figura 2) permitiu identificar as áreas de maior ocorrência e risco da enfermidade no estado. Através do método estimador de densidade de Kernel, verificou-se que a distribuição espacial da leptospirose bovina no estado do Paraná não é uniforme, havendo uma maior concentração da doença em determinadas áreas, principalmente entre as regiões norte/noroeste e sudoeste. A região norte/noroeste concentram a maior população de bovinos especializados na pecuária de corte e apresentaram as maiores prevalências de focos e animais sororeagentes do estado. Estas regiões localizam-se próximas as divisas com os estados de São Paulo (SP) e Mato Grosso do Sul (MS), sendo provável que a intensa movimentação de animais nestas áreas poderia aumentar o risco de infecção pela *Leptospira* spp. A região sudoeste é considerada uma das maiores produtoras de leite do estado, onde predomina a agricultura familiar em que a venda de leite é a fonte principal de renda mensal. As propriedades leiteiras presentes nesta região caracterizam-se por apresentarem alta taxa de renovação de animais, ocorrendo o descarte destes quando a produção de leite não é satisfatória. Desta forma, a alta taxa de reposição de animais realizada neste tipo de exploração zootécnica poderia facilitar a introdução de enfermidades, como a leptospirose, quando realizadas sem controle sanitário.

O sorovar Hardjo (55,22%) foi considerado o mais frequente entre os animais estudados, seguido pelos sorovares Tarassovi (11,42%), associação Hardjo e Wolffi (8,71%), Grippytyphosa (3,91%) e Bratislava (2,30%) (Quadro 5). Similarmente, os sorovares Hardjo (65,76%), associação Hardjo e Wolffi (7,57%), Tarassovi (7,46%), Grippytyphosa (5,97%) e Bratislava (2,24%) foram os mais frequentes entre os rebanhos bovinos analisados (Quadro 6).

O predomínio do sorovar Hardjo detectado neste trabalho concorda com outros estudos realizados em outros estados do país (Oliveira et al., 2001; Homem et al., 2001; Araujo et al., 2005; Castro et al., 2008; Figueiredo et al., 2009; Oliveira et al., 2009). O sorovar Hardjo é considerado adaptado à espécie bovina, que pode comportar-se como reservatório, mantendo a doença no rebanho (Moreira 1994). A maior frequência de bovinos sororeagentes para o sorovar Hardjo detectada neste trabalho sugere que a fonte de infecção mais importante para estes animais seja o próprio bovino infectado.

A detecção de sorovares considerados acidentais para a espécie bovina sugere a participação de espécies domésticas e silvestres na transmissão da *Leptospira* spp para os animais estudados. Os sorovares Tarassovi e Grippytyphosa detectados como os mais frequentes e cujas descrições são relacionadas com animais silvestres (Hidalgo; Sulzer, 1984; Pellegrin et al., 1999), levantam a suspeita do envolvimento destas espécies animais como

reservatórios e potenciais transmissores destes sorovares aos animais estudados. A presença de animais sororeagentes para o sorovar Bratislava, que normalmente circula na população de suínos (Ellis & Thiermann, 1986), sugere a proximidade entre os rebanhos bovinos estudados e com possíveis criações suínas presentes na região. Segundo Ellis (1984), a infecção por *Leptospira* spp nos animais domésticos é determinada por fatores como as espécies animais de contato, os sorovares existentes na região, as condições ambientais e climáticas, além do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta.

Foi observada uma grande frequência de reações cruzadas entre os sorovares Hardjo e Wolffi, entretanto a ocorrência isolada do sorovar Wolffi mostrou-se bastante inferior a de Hardjo. As reações cruzadas entre estes sorovares podem ocorrer por pertencerem ao mesmo sorogrupo Sejroe e por compartilharem determinantes antigênicos semelhantes entre si (Costa et al., 1998). Com o intuito de se conhecer a frequência de reações cruzadas entre os sorovares Hardjo e Wolffi e a importância da inclusão dos dois sorovares na bateria antigênica, as coaglutinações entre estes dois sorovares não foram desconsideradas da análise.

A análise multivariada demonstrou a associação entre o status do rebanho para a *Leptospira* spp e sorovar Hardjo e para as variáveis de risco. Esta análise foi realizada para verificar diferenças estatísticas entre as variáveis de risco associadas para a *Leptospira* spp e para o sorovar Hardjo nos rebanhos estudados. Entretanto, devido a alta prevalência detectada do sorovar Hardjo, os fatores de risco associados tanto para qualquer sorovar como para o sorovar Hardjo foram semelhantes, diferenciando somente em uma única variável.

As propriedades que realizavam a prática de aluguel de pastos apresentaram mais chances de serem positivas para a leptospirose do que propriedades que não realizavam. O risco de introdução da doença, através da prática de aluguel de pastos, em um rebanho livre da enfermidade é grande, principalmente se os animais introduzidos no rebanho estiverem eliminando o agente pela urina.

A compra de animais infectados é amplamente reportada como um dos principais fatores de introdução da leptospirose em rebanhos livres (Castro et al., 2008; Oliveira et al., 2010). Neste trabalho, propriedades que realizavam a compra de animais apresentaram mais chances de serem positivas para a *Leptospira* spp do que propriedades que não realizavam. Estes dados evidenciam a importância desta variável, quando a aquisição de animais é realizada sem controle sanitário, como fator de introdução da doença em propriedades livres.

As variáveis relacionadas ao tamanho do rebanho foram consideradas fatores de risco para a doença. De acordo com Oliveira et al. (2010), o aumento do rebanho pode resultar em aumento da probabilidade de ocorrer a leptospirose, tornando-a mais persistente e de difícil controle e erradicação. Assim, o número elevado de animais no rebanho significa maior risco de introdução e disseminação da enfermidade. Estes dados confirmam os resultados obtidos no estudo de prevalência em que foi verificada maior concentração da infecção nas propriedades com maior número de animais.

A presença de equinos, identificada como fator de risco para a enfermidade, demonstra a possibilidade de contato destes animais com os bovinos estudados. No estado do Paraná, a utilização de equinos como animais de serviço em rebanhos de corte é bastante comum e este estreito convívio pode favorecer a transmissão da leptospirose entre estas espécies animais. De acordo com Murhekar et al. (1998), o ciclo de transmissão da leptospirose envolve a interação entre uma ou mais espécies de reservatórios e hospedeiros, além de fatores favoráveis ao micro-organismo encontrados no meio ambiente.

As propriedades que utilizavam piquete de parição apresentaram mais chances de serem positivas para a leptospirose do que as que não utilizavam. O piquete de parição é uma excelente prática utilizada para facilitar o manejo, assistência ao parto e ao bezerro. Entretanto, esta prática pode facilitar a transmissão do micro-organismo, quando o manejo das instalações é realizado de forma inadequada. A maior concentração de animais no piquete e consequente acúmulo de urina e contato com eventuais produtos de parto e aborto contaminados, associados a falhas de manejo, podem predispor à infecção pela *Leptospira* spp.

Estudos epidemiológicos da leptospirose nos rebanhos bovinos do estado do Paraná são de grande importância, pois contribuem para o monitoramento da saúde animal no estado, viabilizando o controle da enfermidade e minimizando as perdas recorrentes, aspecto considerado essencial para o estado do Paraná, que apresenta a pecuária como importante atividade econômica.

No presente trabalho, a análise de prevalência de focos e de animais demonstrou que a *Leptospira* spp está presente em todos os sete circuitos produtores em que o estado do Paraná foi dividido, sendo possível identificar as áreas de maior risco e de ocorrência da enfermidade nos rebanhos bovinos estudados. O método estimador de densidade de Kernel permitiu estratificar o estado em áreas de risco, através do conhecimento da distribuição espacial da leptospirose, o que possibilita o planejamento de ações de controle mais adequadas, voltadas para as áreas de maior risco. O resultado da análise dos fatores de

risco indica que as características das propriedades e fatores relacionados ao manejo estão associados a soropositividade para a *Leptospira* spp e devem ser considerados em programas de prevenção da doença. Desta forma, os dados epidemiológicos obtidos neste estudo poderão auxiliar na elaboração de estratégias de controle, principalmente nas áreas de maior risco e ocorrência da leptospirose, produzindo melhor resultado na redução da incidência da doença.

#### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado.

#### Referências

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de leptospirose, Brasília, 98p, 1995.

Bolin C.A., Zuerner, R.L. & Trueba, G. 1989. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis in bovine urine. Am. J. Vet. Res. 50: 1001-1003.

Bolin C.A., Cassels, J.A., Zuerner, R.L. & Trueba, G. 1991. Effect of vaccination with monovalent *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis vaccine on type Hardjo-bovis infection of cattle. Am. J. Vet. Res. 52:1639-1643.

Bolin C.A. 2003. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. Proceedings of the 6<sup>th</sup> Western Dairy Management Conference. Reno, N.V-155.

Bonfim M.R.Q. & Koury, M.C. 2006. Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. Vet. Microbiol. 118: 278-288. Boom R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M. & Van Der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.

Borges A.R. & Mezzadri F.P. 2009. Análise da conjuntura agropecuária safra 2009/2010: bovinocultura de corte. Curitiba: SEAB/DERAL. 31 p.

Castro V., Azevedo S.S., Gotti T.B., Batista C.S.A., Gentili J., Moraes Z.M., Souza G.O., Vasconcellos S.A., M.E & Genovez M.E. 2008. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. Arqs. Inst. Biol, São Paulo. 75(1):3-11.

Chappel R.J., Ellia, W.A., Adler, B., Amon, L., Millar, B.D., Zhu, S.S. & Prime, R.W. 1992. Serological evidence for the presence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava in Australian pigs. Aus. Vet. J. 69: 119-120.

- Dhaliwal G.S., Murray, R.D. & Ellis, W.A. 1996. Reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo relative to the year of diagnosis. *Vet. Rec.* 138: 272-276.
- Ellis W.A., O'Brien, J.J. & Cassels, J. 1981. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype Hardjo infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 108: 555-557. Ellis W.A., O'Brien, J.J., Nelly, S.D. & Hanna, J. 1982. Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. *Vet. Rec.* 110: 178-180.
- Ellis W.A. 1984. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Prev. Vet. Med.* 2: 411-421.
- Ellis W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North. Am: Food An Prac.* 10: 463-478.
- Faine S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization Offset Publication[67]. Geneva.
- Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2th ed. Medical Science, Melbourne, Australia. 272p.
- Figueiredo A.O., Pellegrin A.O., Gonçalves V.S.P., Freitas E.B., Monteiro L.A.R.C., Oliveira J.M. & Osório A.L.A.R. 2009. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 29(5):375-381.
- Hashimoto V.Y., Garcia J.L., Spohr K.A.H., Silva F.G., Alves, L.S. & Freitas J.C. 2010. Prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos, caninos, equinos, ovinos e suínos do município de Jaguapita, estado do Paraná, Brasil. *Arqs. Inst. Biol.* 77: 521-524.
- Health S.E. & Johnson, R. 1994. Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205: 1518-1523.
- Heer S., Riley A.E., Nesor J.A., Roux D. & De Lange J.F. 1982. *Leptospira interrogans* serovar Pomona associated with abortion in cattle: isolation methods and laboratory animal histopathology. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 49: 57-62.
- Homem V.S.F., Heinemann M.B., Moraes Z.M., Vasconcellos S.A., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2001. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. *Revta. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(2):173-180.
- IBGE (Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2010. Produção da Pecuária Municipal. 61p.
- Jouglard SDD., Simionatto S., Seixas FK., Nassi, FL. & Dellagostin, AO. 2006. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Can. J. Microbiol.* 52: 747-752. Kirkbride, C.A. 1990. Laboratory Diagnosis of Livestock abortion. Ames: State University Press. 3:59-65.
- Langoni H., Souza, L.C., Silva A.V.; Luvizotto M.C.R.; Paes A.C. & Lucheis S.B. 1999. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 40:271-275.
- Langoni H., Souza, L.C., Da Silva A.V., Cunha E.L.P. & Silva R.C. 2008. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of *anti-Leptospira* spp antibodies, isolation and

- biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 45: 190-199.
- Latorre M.R.D.O. Medidas de risco e regressão logística. IN: Massad, e.; Menezes, R.X.; Silveira, P.S.P.; Ortega, N.R.S. *Métodos quantitativos em medicina*. Barueri: Manole, 2004.p. 337-350. Levett P.N. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microb. Rev.* 14: 296-326.
- Lilenbaum W. & Souza G.N. 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 75: 249-251.
- Lucchesi P.M., Arroyo G. H., Etcheverria A. I., Parma A. E. & Seijo A. C. 2004. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37: 131-134.
- Magajevski F.M., Girio R.J.S., Mathias L.A., Myashiro, S., Genovez M.E. & Scarcelli E.P. 2005.
- Detection of *Leptospira* pp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Braz. J. Microb.* 36: 334-437.
- Myers D.M. 1985. Manual de métodos para El diagnóstico de laboratorio de La leptospirosis. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis.
- Nassi F.L., Seixas F.K., Jouglard S.D., Simionatto S., Silva E.F., Seyffert N., Brod, C.S. & Dellagostin, O.A. 2003. Leptospirosis diagnosis using neted PCR. *Braz. J. Microb.* 34: 90-92.
- Santa Rosa C.A., Camdelli Filho O. & Castro A.F.P. 1973. Suínos como reservatório de leptospirosis no Brasil. *Arqs. Inst. Biol.* 40: 243:246.
- Shönberg A. 1981. Studies on the effect of antibiotics substances on leptospirosis and their cultivation from material with a high bacterial count. *Zent Bakt Parasit Infekt Hyg.* 249:400-406.

**Quadro 1** – Dados censitários da população bovina do estado do Paraná em 2001, segundo circuitos produtores.

N°	Circuitos produtores		Total de rebanhos com atividade reprodutiva	Rebanhos analisadas	Total de fêmeas com idade ≥ 24 meses	Fêmeas analisadas
	Região	Núcleos regionais				
1	Noroeste	Umuarama e Paranaíba	23.104	283	1.140.410	2.730
2	Centro-Oeste/Norte	Campo Mourão, Maringá e Londrina	20.835	280	750.002	2.512
3	Norte Pioneiro	Cornélio Procopio, Ivaiporã e Jacarezinho	27.403	274	972.554	2.195
4	Centro-Sul	Laranjeiras do Sul, Guarapuava e Ponta Grossa	42.738	274	878.916	1.880
5	Oeste	Cascavel e Toledo	33.451	279	616.012	1.898
6	Leste-Sul	Curitiba, União da Vitória, Paranaguá e Irati	18.616	279	173.396	1.271
7	Sudoeste	Francisco Beltrão e Pato Branco	44.126	257	517.315	1.677
		<b>Total</b>	<b>210.273</b>	<b>1.926</b>	<b>5.048.605</b>	<b>14.163</b>

**Quadro 2** – Prevalência de animais sororeagentes para leptospirose, segundo circuito produtor, no estado do Paraná, 2001-2002.

Circuito produtor	Animais testados	Animais sororeagentes	Prevalência	
			%	IC 95%*
1- Noroeste	2.730	802	41,13	[34,07-48,20]
2- Centro-Oeste/Norte	2.512	912	47,29	[39,33-55,25]
3- Norte Pioneiro	2.195	590	34,89	[27,70-42,09]
4- Centro-Sul	1.880	647	48,09	[41,29-54,89]
5- Oeste	1.898	291	22,96	[14,33-31,60]
6- Leste-Sul	1.271	221	28,59	[18,70-38,48]
7- Sudoeste	1.677	224	24,43	[15,31-33,56]
<b>Total</b>	<b>14.163</b>	<b>3.687</b>	<b>37,70</b>	<b>[34,54-40,86]</b>

\*Intervalo de confiança de 95%

**Quadro 3** – Prevalência de focos de leptospirose, segundo circuito produtor, no estado do Paraná, 2001-2002.

Circuito produtor	Rebanhos testados	Rebanhos reagentes	Prevalência	
			%	IC 95%*
1- Noroeste	283	220	77,74	[72,44-82,45]
2- Centro-Oeste/Norte	280	231	82,50	[77,53-86,76]
3- Norte Pioneiro	274	163	59,49	[53,42-65,35]
4- Centro-Sul	274	181	66,06	[60,12-71,65]
5- Oeste	279	97	34,77	[29,19-40,67]
6- Leste-Sul	279	77	27,60	[22,44-33,24]
7- Sudoeste	257	103	40,08	[34,04-46,35]
Total	1.926	1.072	54,28	[52,05-56,51]

\*Intervalo de confiança de 95%

**Quadro 4** – Prevalência de focos de leptospirose por tipo de exploração zootécnica, segundo circuito produtor, no estado do Paraná, 2001-2002.

Circuito produtor	Corte		Leite		Misto	
	Prev (%)	IC (95%)	Prev (%)	IC (95%)	Prev (%)	IC (95%)*
1- Noroeste	81,01	[70,62-88,96]	83,67	[74,84-90,37]	69,81	[60,13-78,35]
2- Centro-Oeste/Norte	90,91	[81,25-96,59]	81,56	[74,16-87,59]	76,39	[64,91-85,60]
3- Norte Pioneiro	81,48	[68,57-90,74]	53,33	[42,51-63,93]	54,61	[45,65-63,36]
4- Centro-Sul	81,25	[69,54-89,92]	61,39	[51,18-70,91]	61,68	[51,78-70,91]
5- Oeste	54,17	[32,82-74,45]	32,89	[25,50-40,97]	33,33	[24,31-43,35]
6- Leste-Sul	42,86	[26,32-60,65]	32,00	[23,02-42,08]	20,57	[14,23-28,18]
7- Sudoeste	75,00	[47,62-92,73]	42,57	[32,79-52,81]	33,81	[26,01-42,32]
Total	76,92	[72,06-81,31]	55,17	[51,61-58,69]	41,18	[43,66-50,71]

\*Intervalo de confiança de 95%

**Quadro 5** – Sorovares de *Leptospira* spp prevalentes nos animais sororeagentes do estado do Paraná, 2001-2002.

Hardjo	2.036/3.687	55,22
Tarassovi	421/3.687	11,42
Hardjo e Wolffi	321/3.687	8,71
Empate sorológico	305/3.687	8,27
Grippotyphosa	144/3.687	3,91
Bratislava	85/3.687	2,30
Wolffi	82/3.687	2,22
Autumnalis	79/3.687	2,14
Australis	55/3.687	1,49
Pomona	33/3.687	0,89
Pyrogenes	27/3.687	0,73
Copenhageni	21/3.687	0,57
Shermani	18/3.687	0,49
Canicola	13/3.687	0,36
Castellonis	13/3.687	0,36
Sentot	11/3/687	0,30
Icterohaemorrhagiae	9/3.687	0,24
Butembo	9/3.687	0,24
Bataviae	2/3.687	0,05
Cynopteri	1/3.687	0,03
Panama	1/3.687	0,03
Whitcombi	1/3.687	0,03

**Quadro 6** – Sorovares de *Leptospira* spp prevalentes nos rebanhos sororeagentes do estado do Paraná, 2001-2002.

Sorovar	Proporção de rebanhos sororeagentes	Prevalência (%)	IC 95%*
Hardjo	705/1.072	65,76	[62,84-68,60]
Hardjo e Wolffii	81/1.072	7,57	[6,04-9,30]
Tarassovi	80/1.072	7,47	[5,97-9,20]
Grippotyphosa	64/1.072	5,97	[4,63-7,56]
Bratislava	24/1.072	2,24	[1,44-3,31]
Wolffii	22/1.072	2,05	[1,29-3,09]
Autumnalis	17/1.072	1,58	[0,93-2,53]
Shermani	17/1.072	1,58	[0,93-2,53]
Australis	11/1.072	1,03	[0,51-1,83]
Canicola	11/1.072	1,03	[0,51-1,83]
Pomona	10/1.072	0,93	[0,45-1,71]
Pyrogenes	10/1.072	0,93	[0,45-1,71]
Sentot	05/1.072	0,47	[0,15-1,08]
Castellonis	04/1.072	0,37	[0,10-0,95]
Icterohaemorrhagiae	04/1.072	0,37	[0,10-0,95]
Copenhageni	03/1.072	0,28	[0,06-0,81]
Butembo	02/1.072	0,19	[0,02-0,67]
Cynopteri	01/1.072	0,09	**
Hebdomadis	01/1.072	0,09	**

\*Intervalo de confiança de 95%

\*\*Não foi possível calcular

**Quadro 7** – Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para à infecção por qualquer sorovar de *Leptospira* spp em rebanhos bovinos do estado do Paraná, 2001-2002.

Variável	Expostos/Positivos	Expostos/Negativos	P
Rebanho confinado/semi-confinado	197/1.068	197/844	0,009
Exploração de corte	260/1.068	78/850	0,000
Raças puras	411/1.039	229/825	0,000
Ter mais de 49 bovinos	424/1.072	67/854	0,000
Ter mais de 20 fêmeas acima de 24 meses	407/1.066	63/847	0,000
Utiliza a inseminação artificial	168/1.044	200/834	0,000
Contato com ovinos e caprinos	182/1.072	79/854	0,000
Contato com equinos	810/1.072	445/854	0,000
Contato com suínos	707/1.072	602/854	0,034
Contato com cães	964/1.072	779/854	0,337
Contato com animais silvestres	346/1.072	194/854	0,000
Histórico de aborto	225/1.053	130/833	0,001
Deixa produtos de aborto na pastagem	346/787	270/534	0,000
Compra de animais para reprodução	615/1.066	286/846	0,000
Venda de animais para reprodução	308/1.060	121/841	0,000
Abate animais na propriedade	109/1.053	290/830	0,000
Aluga pasto	189/1.068	63/845	0,000
Pasto comum com outras propriedades	164/1.065	84/848	0,000
Presença de áreas alagadiças	256/1.064	226/836	0,139
Presença de piquetes de parição	345/1.064	165/826	0,000

**Quadro 8** – Distribuição das variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para à infecção pelo sorovar Hardjo em rebanhos bovinos do estado do Paraná, 2001-2002.

Variável	Expostos/Positivos	Expostos/Negativos	p
Rebanho confinado/semi-confinado	122/627	197/845	0,076
Exploração de corte	167/627	79/851	0,000
Raças puras	249/609	229/826	0,000
Ter mais de 49 bovinos	274/629	68/855	0,000
Ter mais de 20 fêmeas acima de 24 meses	261/626	63/848	0,000
Utiliza a inseminação artificial	89/613	200/835	0,000
Contato com ovinos e caprinos	116/629	79/855	0,000
Contato com equinos	492/629	444/855	0,000
Contato com suínos	415/629	603/855	0,062
Contato com cães	559/629	780/855	0,131
Contato com animais silvestres	203/629	194/855	0,000
Histórico de aborto	134/613	130/834	0,002
Deixa produtos de aborto na pastagem	216/466	271/535	0,012
Compra de animais para reprodução	375/627	286/847	0,000
Venda de animais para reprodução	195/624	121/842	0,000
Abate animais na propriedade	56/619	290/831	0,000
Aluga pasto	130/626	63/846	0,000
Pasto comum com outras propriedades	100/624	84/849	0,000
Presença de áreas alagadiças	148/624	225/837	0,170
Presença de piquetes de parição	203/623	165/827	0,000

**Quadro 9** – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados à infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp em rebanhos com atividade reprodutiva do estado do Paraná, 2001-2002.

Variáveis	Casos	Expostos	P	OR <sup>1</sup>	IC 95%
Aluguel de pasto	189	252	0,000	1,91	[1,36-2,68]
Presença de equinos	810	1255	0,000	1,59	[1,28-1,97]
Presença de > 20 fêmeas com idade ≥ 24 meses	407	470	0,000	2,25	[1,46-3,49]
Presença de > 49 bovinos	424	491	0,000	2,78	[1,82-4,26]
Compra de reprodutores	615	901	0,000	1,96	[1,59-2,41]
Presença de piquete de parição	345	510	0,022	1,32	[1,04-1,68]

R<sup>2</sup> = 24,80%

<sup>1</sup>Odds ratio

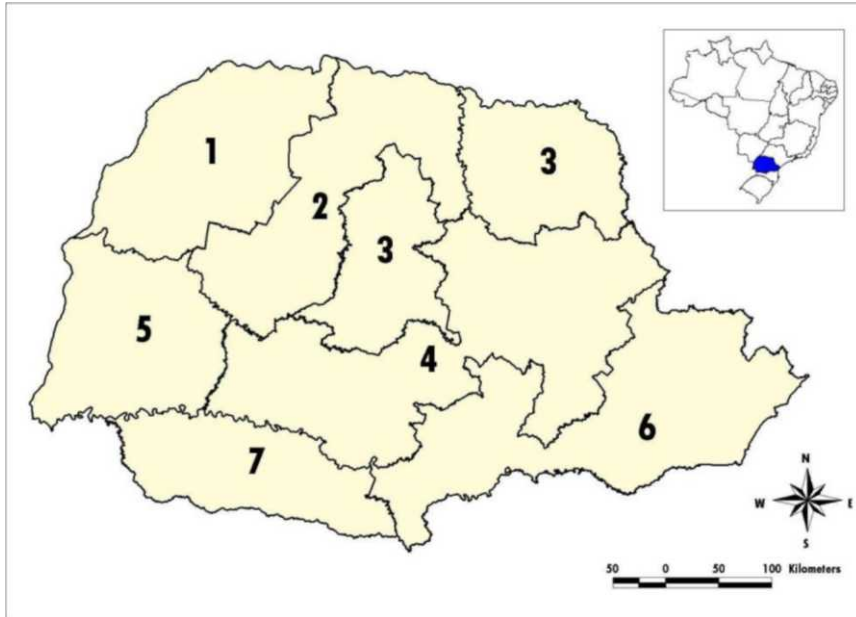
**Quadro 10** – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados à infecção pelo sorovar Hardjo em rebanhos com atividade reprodutiva do estado do Paraná, 2001-2002.

Variáveis	Casos	Expostos	p	OR <sup>1</sup>	IC 95%
Presença de > 49 bovinos	274	342	0,000	3,05	[1,94-4,80]
Presença de > 20 fêmeas com idade ≥ 24 meses	261	324	0,000	2,38	[1,50-3,79]
Presença de equinos	492	936	0,000	1,87	[1,45-2,43]
Compra de reprodutores	375	661	0,000	2,14	[1,68-2,72]
Aluguel de pasto	130	193	0,000	2,22	[1,54-3,21]

R<sup>2</sup> = 30,1%

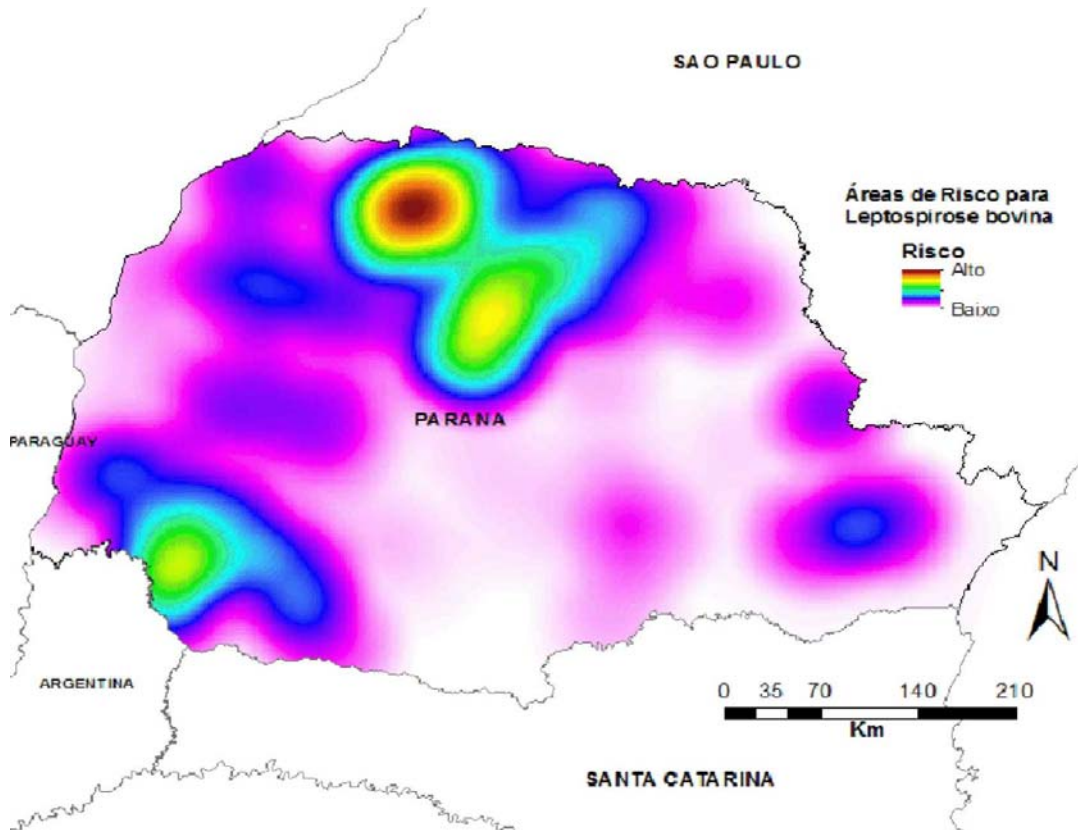
<sup>1</sup>Odds ratio

**Fig.1** – Mapa do estado do Paraná, demonstrando os circuitos e respectivos núcleos regionais.



- Circuito 1: **Região Noroeste**- (núcleos regionais: Umuarama e Paranavaí)  
 Circuito 2: **Região Centro-oeste/Norte**- (núcleos regionais: Campo Mourão, Maringá e Londrina)  
 Circuito 3: **Norte Pioneiro**- (núcleos regionais: Cornélio Procópio, Ivaiporã e Jacarezinho)  
 Circuito 4: **Região Centro-sul**- (núcleos regionais: Laranjeiras do sul, Guarapuava e Ponta Grossa)  
 Circuito 5: **Região Oeste**- (núcleos regionais: Cascavel e Toledo)  
 Circuito 6: **Região Leste/Sul**- (núcleos regionais: Curitiba, União da Vitória, Paranaguá e Irati)  
 Circuito 7: **Região Sudoeste**- (núcleos regionais: Francisco Beltrão e Pato Branco)

**Fig.2** – Distribuição espacial das áreas de risco para leptospirose bovina em propriedades localizadas no estado do Paraná.



## 4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO<sup>1</sup>

### 4.1 PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À LEPTOSPIROSE EM REBANHOS BOVINOS DA REGIÃO CENTRO-SUL DO ESTADO DO PARANÁ

**Trabalho 2246 LD  
(Adapt.p.PVB, 22.711)**

#### **Prevalência e fatores de risco associados à leptospirose em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná<sup>2</sup>**

Vanessa Y. Hashimoto<sup>3</sup>, Juliana A. Dias<sup>4</sup>, Kledir A. H. Spohr<sup>5</sup>, Maria C.P. Silva<sup>6</sup>, Maria G.B. Andrade<sup>6</sup>, Ernst E. Müller<sup>7</sup>, Julio C. Freitas<sup>7\*</sup>

**ABSTRACT** - Hashimoto V.Y., Dias J.A., Spohr K.A.H., Silva M.C.P., Andrade M.G.B., Müller E.E., Freitas, J.C. 2011. [**Prevalence and risk factors for *Leptospira* spp in cattle herds in the south central region of Paraná state.**] Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid 380, Cx. Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brazil. E-mail:freitasj@uel.br

The aim of this study was to determine the prevalence of leptospirosis and the risk factors for this disease in breeding cattle herds in the south central region of Paraná state. It was based on the statistic delineation, serological samples and information regarding the selected farms employed in the study of bovine brucellosis for Paraná state in the context of National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis. A total of 1.880 females aged >24 months from 274 herds not vaccinated against leptospirosis were studied. Serum samples were tested for antibodies against *Leptospira* spp using microscopic agglutination test (MAT) with 22 serovars. The epidemiological questionnaire was applied on all the selected farms and aimed to obtain epidemiological data. Hundred eighty one of 274 herds were positive for *Leptospira* spp, presenting prevalence of positive herds of 66,06% (I.C.95%=60,12-71,65%). Presence of >43 bovines (OR=3,120; I.C=1,418-6,867), animal

<sup>1</sup> Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico **Pesquisa Veterinária Brasileira**, disponível em <http://www.pvb.com.br/>

<sup>2</sup> Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid 380, Cx. Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>4</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa-Rondônia, BR 364 Km 5,5, Cx. Postal 127, Porto Velho, Rondônia, Brasil.

<sup>5</sup> Professor de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, Avenida Beira Rio, 3100, Jardim Europa, CEP 78015-480, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

<sup>6</sup> Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná, Rua dos funcionários, 1558, Bairro Cabral, CEP 86051-980, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>7</sup> Professor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid 380, Cx. Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brasil. E-mail:freitasj@uel.br

purchase (O.R=2,010; I.C=1,154-3,500), rent of pastures (O.R=2,925; I.C=1,060-8,068) and presence of maternity paddock (O.R=1,981; I.C=1,068-3,676) were identified as risk factors for leptospirosis due to any serovar in the multivariate logistic regression. Risk factors for leptospirosis due to serovar Hardjo were presence of > 43 bovines (O.R=3,622; I.C=1,512-8,677), animal purchase (O.R=3,143; I.C=1,557-6,342), rent of pastures (O.R=4,070; I.C=1,370-12,087) and presence of horses (O.R=2,981; I.C=1,321-6,726). These results indicate that *Leptospira* spp infection is widespread in the south central region of Paraná state and that factors related to the herd characteristic and management are associated with the infection.

**INDEX TERMS:** Prevalence. Epidemiology. Risk factors. Leptospirosis. Microscopic agglutination test.

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de leptospirose e os fatores de risco associados a esta doença em rebanhos bovinos com atividade reprodutiva da região centro-sul do estado do Paraná. Foram utilizados o delineamento estatístico, as amostras sorológicas e as informações referentes às propriedades empregadas no estudo da brucelose bovina no estado do Paraná dentro do Contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Foram estudadas 1.880 fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de 274 rebanhos não vacinados contra a leptospirose. Para o diagnóstico sorológico da infecção foi utilizada a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) com 22 sorovares de *Leptospira* spp. Em cada propriedade foi aplicado um questionário epidemiológico para a obtenção de informações epidemiológicas e práticas de manejo empregadas. Dos 274 rebanhos analisados, 181 foram considerados positivos para a leptospirose, com a prevalência de rebanhos de 66,06% (I.C.95%=60,12-71,65%). Presença de > 43 bovinos (OR=3,120; I.C=1,418-6,867), compra de reprodutores (O.R=2,010; I.C=1,154-3,500), aluguel de pasto (O.R=2,925; I.C=1,060-8,068), presença de piquete de parição (O.R=1,981; I.C=1,068-3,676) foram identificados como fatores de risco para a infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp na análise de regressão logística multivariada. Os fatores de risco para a infecção pelo sorovar Hardjo foram presença de > 43 bovinos (O.R=3,622; I.C=1,512-8,677), compra de reprodutores (O.R=3,143; I.C=1,557-6,342), aluguel de pasto (O.R=4,070; I.C=1,370-12,087) e presença de equinos (O.R=2,981; I.C=1,321-6,726). Estes resultados indicam que a infecção pela *Leptospira* spp está amplamente distribuída na região centro-sul do estado do Paraná e que fatores de relacionados às características das propriedades e ao manejo estão associados à infecção.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Prevalência. Epidemiologia. Fator de risco. Leptospirose. Soroaglutinação microscópica.

#### 4.1.1 Introdução

A leptospirose é uma zoonose mundialmente difundida, causada pela infecção de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. Na espécie bovina, esta doença é responsável por elevadas perdas econômicas na pecuária mundial devido ao comprometimento no desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos (Ellis 1994).

Nas criações de bovinos, a disseminação de leptospiras é caracterizada principalmente pela presença de animais doentes ou portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina, descargas cérvico-vaginais, fetos abortados e placenta, mantendo a doença endêmica na propriedade (Faine et al. 1999). Outros fatores como a existência de sorovares de leptospiras na região, a criação simultânea de animais de diversas espécies, a presença de animais silvestres, as condições ambientais e climáticas, além do manejo entre outros também podem influenciar o contato do bovino com o microrganismo (Ellis 1984).

No Brasil, a soroprevalência da leptospirose bovina é extremamente variada, tanto em rebanhos, (Favero et al. 2001, Homem et al. 2001, Thompson et al. 2006, Lage et al. 2007) quanto o tipo de exploração corte ou leite (Langoni et al. 2000, Favero et al. 2001). Os levantamentos sorológicos já efetuados no Brasil têm encontrado o predomínio de reações para o sorovar Hardjo nos rebanhos bovinos brasileiros (Favero et al. 2002, Genovez et al. 2004, Castro et al. 2008, Figueiredo et al. 2009). No estado do Paraná, o sorovar Hardjo também é considerado o mais freqüente (Giraldi 2003).

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência da leptospirose e os fatores de risco associados à esta doença em rebanhos bovinos com atividade reprodutiva da região centro-sul do estado do Paraná.

#### 4.1.2 Material e Métodos

##### 4.1.2.1 População estudada

Foi examinada uma amostra representativa da população bovina da região centro-sul do estado do Paraná (Fig.1), aproveitando-se o banco de soros colhidos para o estudo da soropidemiologia da brucelose bovina no estado, no contexto do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT). Esta região inclui os núcleos regionais de administração da Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SEAB-PR) de Laranjeiras do Sul, Guarapuava e Ponta Grossa, e envolve 40 municípios com 18.616 propriedades com exploração de bovídeos, 1.558.365 bovídeos e 878.916 fêmeas com idade superior a 2 anos (Paraná 2001).

#### 4.1.2.2 Delineamento amostral

A amostragem foi realizada em duas etapas. Primeiro, a seleção aleatória de um número pré-estabelecido de propriedades, que representam as unidades primárias de amostragem. Dentro das unidades primárias, foi amostrado de forma aleatória um número pré-estabelecido de animais (unidades secundárias), com a finalidade de determinar o estado sanitário do rebanho.

O cálculo do número de rebanhos foi determinado pelo grau de confiança do resultado, pelo nível de precisão desejado e pelo valor da prevalência esperado (Noordhuizen et al. 1997), utilizando-se a fórmula para amostras simples aleatórias, segundo Thrusfield (1995) e Noordhuizen et al. (1997):

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot \sqrt{P(1-P)}}{d^2}$$

Onde:

$n$  = número de propriedades amostradas por circuito produtor;

$Z_{\alpha}$  = valor da distribuição normal para o grau de confiança de 95%;

$P$  = prevalência esperada, fixada em 20%;

$d$  = precisão, fixada em 5%.

A seleção aleatória dos rebanhos, para cada circuito produtor, foi realizada a partir do cadastro de propriedades existentes junto à base da Unidade Veterinária Local correspondente. Para cada município, as propriedades existentes foram numeradas e os dados armazenados em planilhas do programa Microsoft Excel 2000®. As propriedades amostradas foram selecionadas aleatoriamente, considerando-se o número de propriedades do município e o número de propriedades amostradas no circuito produtor.

O planejamento amostral para as unidades secundárias estimou o número mínimo de animais a serem examinados por propriedade, de forma a permitir a sua classificação como foco ou não foco.

O número de animais selecionados por rebanho foi determinado pelo programa Herdacc®, *version 3* (University of Guelph), considerando-se os valores de sensibilidade e especificidade agregada dos procedimentos de diagnóstico empregados para o estudo da brucelose, prevalência intra-rebanho e erro padrão (Paraná 2001).

Em rebanhos constituídos por até 99 fêmeas, com idade igual ou superior a 24 meses, foram examinados dez animais ou todas as fêmeas nesta faixa etária nos rebanhos

com menos de dez animais. Em rebanhos constituídos por mais de 99 fêmeas, foram amostradas 15 fêmeas (Paraná 2001). A seleção dos animais dentro da propriedade foi aleatória utilizando-se dois métodos, a amostragem aleatória simples ou a aleatória sistemática.

Foram examinadas um total de 1.880 fêmeas com idade > 24 meses, provenientes de 274 rebanhos não vacinados contra leptospirose.

#### 4.1.2.3 Colheita das amostras de sangue e dados epidemiológicos

A colheita de sangue foi realizada no período de dezembro de 2001 a julho de 2002, por meio de punção da veia jugular utilizando agulha descartável estéril e tubo com vácuo, previamente identificado. As amostras de soro foram armazenadas em microtubos de plástico e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O questionário epidemiológico foi aplicado em todas as propriedades selecionadas para a obtenção de informações de sistemas de produção e de manejo existentes.

#### 4.1.2.4 Teste sorológico

Os soros foram submetidos à prova de soroglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos (Faine et al. 1999). Foram utilizados 22 sorovares de referência: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcomb, Cynopteri, Fortbragg, Grippytyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Sentot e Tarassovi. Os antígenos foram mantidos a  $28^{\circ}\text{C}$  por cinco a dez dias em meio EMJH (DIFCO®-USA). As amostras de soros que apresentaram na SAM pelo menos 50% das leptospiros aglutinadas na diluição de 1:100 foram consideradas reagentes e então diluídas geometricamente na razão dois para determinação da diluição máxima positiva.

No animal, o provável sorovar infectante foi o que apresentou o maior título. Com exceção da associação entre os sorovares Hardjo e Wolffi, os animais que apresentaram títulos mais elevados idênticos para dois ou mais sorovares foram excluídos desta análise e considerados reatores para a *Leptospira* spp.

Na propriedade, o provável sorovar infectante foi o que apresentou o maior título e o maior número de reações positivas. Uma propriedade foi considerada positiva (foco) quando apresentou pelo menos um animal sororeagente na propriedade.

#### 4.1.2.5 Análise de dados

As informações dos questionários aplicados, assim como os resultados da sorologia e a condição da propriedade, foram armazenadas num banco de dados com o emprego do programa Microsoft Access® e critérios estabelecidos pelo programa Herdacc®, *version 3* (University of Guelph) que considerou o tamanho da população, prevalência intra-rebanho de 50%, sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico utilizado (SAM), de modo a serem obtidos a sensibilidade e especificidade de rebanho superiores a 90%.

Como a amostra de unidades primárias no circuito produtor foi aleatória sistemática (Cochran 1977), a prevalência aparente de focos de leptospirose foi calculada tendo como parâmetros o número de focos e o número de propriedades amostradas (Dean et al. 1994). Os cálculos das prevalências de focos e os respectivos intervalos de confiança foram realizados com o auxílio do programa Epilnfo 6.04d (Dean et al. 1994).

As variáveis relacionadas no questionário epidemiológico permitiram o estudo dos fatores de risco. As variáveis analisadas foram: tipo de criação; tipo de exploração; raça predominante; número total de bovinos existentes; número de fêmeas acima de 24 meses; presença de outras espécies domésticas; presença de espécies silvestres de vida livre; uso de inseminação artificial; destino de fetos e placentas; compra ou venda de machos e/ou fêmeas para reprodução; pastagens em comum com outras propriedades; prática de aluguel de pasto; piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto e ocorrência de aborto.

As categorias das variáveis foram organizadas e apresentadas em escala crescente de risco. Quando necessário foi realizada a recategorização dessas variáveis. A categoria de menor risco foi considerada como base para a comparação das demais. As variáveis quantitativas foram recategorizadas em quartis.

A análise univariada foi empregada para a verificação da associação entre o *status* do rebanho para a leptospirose e especificamente para o sorovar Hardjo (ausência de animais positivos =0; presença de um animal soropositivo =1) e variáveis de risco, utilizando o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher. As variáveis com valor de  $p < 0,2$  na análise univariada foram incluídas na análise de regressão logística multivariada (Hosmer & Lemeshow 1989). As análises foram realizadas com o programa SPSS *version 9.0* (SPSS INC 1999a).

### 4.1.3 Resultados

#### 4.1.3.1 Caracterização da amostra

O número de animais nas propriedades selecionadas variou entre um a 2.667, apresentando mediana de 16 animais. A dispersão do número de bovinos, segundo o sistema de exploração zootécnica das propriedades selecionadas é apresentada na Fig. 2.

Na amostragem estudada, 98,4% das propriedades de corte eram de criação extensiva, com predomínio (45,31%) de raças zebuínas. A aquisição de animais para a reprodução era realizada em 78,12% das propriedades, sendo 68,75% proveniente diretamente de outras fazendas.

Dos rebanhos leiteiros amostrados, as criações extensivas predominaram em 76,23%, com 51,4% dos rebanhos constituídos por raças europeias especializadas na produção de leite. A compra de reprodutores era realizada por 49,5% das propriedades, sendo 40,6% proveniente diretamente de outras fazendas. A média de produção na região é de 48,47 L/leite/dia.

As propriedades mistas caracterizaram-se por criações extensivas (95,3%), com predomínio (71,9%) de animais de composição racial mista. A monta natural é o método de reprodução utilizado predominantemente (83,2%) e a ordenha era realizada manualmente em 83,2% das propriedades amostradas. A compra de reprodutores era realizada em 39,04% das propriedades, sendo 69,15% proveniente de outras fazendas.

#### 4.1.3.2 Prevalência de propriedades reagentes

Das 1.880 fêmeas bovinas examinadas, 647 foram reagentes na SAM para qualquer um dos 22 sorovares de *Leptospira* spp, com títulos variando entre 100 e 3.200.

Dos 274 rebanhos examinados, 181 (66,06% >; I.C.95% >=60,12-71,65% >) apresentaram pelo menos um animal reagente na SAM para qualquer sorovar.

No quadro 1 são apresentados os dados de prevalência de focos de leptospirose segundo o sistema de exploração zootécnica na região centro-sul do estado do Paraná.

No quadro 2 são demonstrados os sorovares de *Leptospira* spp prevalentes nas propriedades positivas da região centro-sul do estado do Paraná.

#### 4.1.3.3 Análise dos fatores de risco

Nos quadros 3 e 4 são apresentadas as variáveis relacionadas às características de propriedades e de manejo mais intensamente associadas à presença ou ausência da infecção para qualquer um dos 22 sorovares de *Leptospira* spp utilizados e isoladamente para o sorovar Hardjo, respectivamente, nos rebanhos da região centro-sul do estado do Paraná.

Os fatores de risco associados à infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp e sorovar Hardjo identificados na análise de regressão logística multivariada são descritos nos quadros 5 e 6, respectivamente.

#### 4.1.4 Discussão

A detecção de 647 animais reagentes na SAM em 181 (66,06%) propriedades da região centro-sul do estado do Paraná indica a presença da leptospirose em grande parte do território estudado. No Brasil, estudos sorológicos realizados em animais de produção também demonstraram que a infecção por este microrganismo está bastante difundida (Castro et al. 2008, Figueiredo et al. 2009, Oliveira et al. 2009).

Os rebanhos especializados na pecuária de corte apresentaram uma maior prevalência (81,25%) da leptospirose quando comparados a outros tipos de exploração zootécnica presentes na região estudada. Vasconcellos et al. (1997) examinando rebanhos leiteiros e de corte em seis estados brasileiros, encontraram uma frequência mais elevada de soropositividade para a leptospirose entre os bovinos de corte. Prescott et al. (1988) relataram que as diferentes práticas de manejo empregadas em rebanhos bovinos de corte podem propiciar a manutenção de leptospirosas neste tipo de exploração.

O sorovar Hardjo (54,70%) foi o mais frequente entre os rebanhos bovinos estudados. Este sorovar é considerado o mais difundido mundialmente entre os bovinos, inclusive no Brasil (Giraldi 2003, Lage et al. 2007, Castro et al. 2008, Figueiredo et al. 2009). O sorovar Hardjo é considerado adaptado à espécie bovina que pode comportar-se como reservatório, mantendo a doença no rebanho (Moreira 1994). A maior frequência de bovinos sororeatores para o sorovar Hardjo detectada no presente trabalho sugere que a fonte de infecção mais importante para estes animais seja o próprio bovino infectado.

A frequência de rebanhos sororeagentes para os sorovares Grippotyphosa (7,74%) e Shermani (7,18%) sugere a participação de espécies domésticas e silvestres na

transmissão da *Leptospira* spp para os animais estudados. Pellegrin et al. (1999) encontraram uma alta frequência de animais reatores para os sorovares Grippotyphosa e Shermani em bovinos do estado do Mato Grosso e ressaltaram que a ocorrência destes sorovares nos animais estudados poderiam estar relacionadas a presença de animais silvestres na região estudada. De fato, os sorovares de *Leptospira* spp presentes em uma determinada região estão associados à presença de um ou mais hospedeiros de manutenção, que servem como reservatórios naturais do microrganismo (Bolin 1996).

Por pertencerem ao mesmo sorogrupo e, portanto, possuírem afinidades antigênicas, podem ocorrer reações cruzadas entre os sorovares Hardjo e Wolffi (Faine et al., 1999). Isto foi verificado no presente estudo (1,66%), embora a ocorrência de Wolffi (0,55%) de forma isolada mostrou-se bastante inferior à de Hardjo (54,70%). Com o intuito de se conhecer a frequência de reações cruzadas entre eles e a importância da inclusão dos dois sorovares na coleção de antígenos, as coagulações entre os sorovares Hardjo e Wolffi não foram desconsiderados da análise.

A análise multivariada dos fatores de risco para a infecção por *Leptospira* spp em rebanhos bovinos da região centro-sul indicou que as propriedades com número > 43 fêmeas possuem maiores chances de serem positivas para a leptospirose que propriedades com menor número de fêmeas. Alonso Andicoberry et al. (2001) referiram que, o tamanho do rebanho pode influenciar a manutenção da *Leptospira* spp em determinadas populações.

Entretanto, a prevalência da leptospirose em uma região dependerá, sobretudo, da presença de animais portadores, que eliminem o microrganismo na urina, da contaminação do ambiente com leptospirosas vivas, da sobrevivência das mesmas no ambiente e do contato dos animais suscetíveis com o agente (Niang et al. 1994).

A compra de reprodutores foi identificada neste estudo como fator de risco para a doença. No Paraná, Rodrigues et al. (1999) detectaram anticorpos anti-leptospirosas contra o sorovar Hardjo somente em duas das 14 propriedades estudadas, as quais eram as únicas que realizavam a compra frequente de animais. Tocantins (2007) ressaltou que, a compra de animais, sem a realização de controle sanitário, pode levar a introdução, manutenção e disseminação de doenças, como a leptospirose.

Neste trabalho, propriedades que utilizavam a prática de aluguel de pastos apresentaram mais chances de serem positivas para a leptospirose que propriedades que não utilizavam. O risco de introdução da leptospirose, através da prática de aluguel de pastos, em um rebanho livre da enfermidade é grande, se o rebanho introduzido na área estiver eliminando o agente pela urina. As leptospirosas podem permanecer no ambiente por longos

períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, o que aumentaria a chance de contato e a infecção de rebanhos cujas propriedades apresentem este tipo de manejo.

A presença de piquetes de parição foi um fator de risco para a leptospirose. A maior concentração de animais no piquete e conseqüente acúmulo de urina e contato com eventuais produtos de parto e aborto contaminados podem favorecer a infecção por *Leptospira* spp de fêmeas e bezerros presentes neste ambiente, principalmente em propriedades onde não exista um manejo sanitário correto.

No presente estudo, a presença de eqüinos foi considerada um fator de risco à infecção pelo sorovar Hardjo. Na região estudada, a utilização de eqüinos como animais de serviço em rebanhos bovinos de corte é bastante comum. O estreito convívio entre estes animais pode favorecer a infecção dos eqüinos pelo sorovar Hardjo e conseqüentemente, podem contribuir para a disseminação da enfermidade nas propriedades estudadas.

A alta prevalência de focos de leptospirose nas propriedades da região centro-sul do estado do Paraná indica que o microrganismo está amplamente distribuído, principalmente entre os bovinos de corte. A análise de fatores de risco associados à infecção pela *Leptospira* spp nas propriedades estudadas mostra que as medidas de controle devem ser adotadas nos cuidados referentes à compra de animais, o aluguel de pastos entre propriedades e o uso de piquetes de parição sem um correto manejo sanitário devem ser desestimulados. Os rebanhos livres da infecção devem evitar tanto o contato direto como o indireto com bovinos e outras espécies animais oriundos de locais que possuam histórico sanitário desconhecido.

Os dados epidemiológicos obtidos neste estudo poderão auxiliar na elaboração de estratégias de controle fundamentadas nos estudos da análise dos fatores de risco associados à infecção pela *Leptospira* spp na região centro-sul do estado do Paraná.

#### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado.

## Referências

- Alonso Andicoberry, C., García Peña, F.J., Pereira Bueno, J., Costas, E. & Ortega Mora, L.M. 2001. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Prev. Vet. Med.* 52:109-117.
- Bolin C.A. 1996. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery. (Small Animals)*. 11(3):166-171
- Castro V., Azevedo S.S., Gottil T.B., Batista C.S.A., Gentilil J., Moraes Z.M., Souza G.O., Vasconcellos S.A., M.E & Genovez M.E. 2008. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. *Arqs. Inst. Biol, São Paulo*. 75(1):3-11.
- Cochran W.G. 1997. *Sampling techniques*. 3<sup>ª</sup>.ed. John Wiley & Sons, New York. 428p. Dean A.G., Dean J.A., Colombier D., Brendel K.A., Smith D.C., Burton A.H., Dicker R.C., Sullivan K., Fagan R.F. & Arner T.G. 1994. *Epi-Info, Version 6: a word processing database and statistics program for epidemiology on microcomputers*. CDC, Atlanta. 601p.
- Ellis W.A. 1984. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Prev. Vet. Med.* 2:411-421.
- Ellis W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim.Pract.* 10(3):463-478.
- Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*. 2th ed. Medical Science, Melbourne, Australia. 272p.
- Favero M., Pinheiro S.R., Vasconcellos S.A., Morais Z.M., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2001. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. *Arqs Inst. Biol, São Paulo*. 68(2):29-35. Favero A.C.M., Pinheiro S.R., Vasconcellos S.A., Morais Z.M., Ferreira F & Ferreira Neto J.S. 2002. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. *Ciência Rural, Santa Maria*. 32(4):613-619.
- Figueiredo A.O., Pellegrin A.O., Gonçalves V.S.P., Freitas E.B., Monteiro L.A.R.C., Oliveira J.M. & Osório A.L.A.R. 2009. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 29(5):375-381.
- Genovez M.E., Oliveira J.C., Castro V., Ferrari C.I.L., Scarcelli E., Cardoso M.V., Paulin L.M. & LANÇA NETO P. 2004. Serological profile of a nelore herd presenting endemic leptospirosis and submitted to vaccination. *Arqs. Inst. Biol.* 1(4):411-416.
- Giraldi N. 2003. Avaliação da infecção por leptospira em fêmeas bovinas enviadas ao abate no Norte do Paraná, através de diferentes técnicas diagnosticas, 2003. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 75p.

- Homem V.S.F., Heinemann M.B., Moraes Z.M., Vasconcellos S.A., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2001. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. *Revta. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(2):173-180.
- Hosmer Jr D.W. & Lemeshow S. 1989. *Applied logistic regression*. Wiley, New York. 307p.
- Lage A.P., Leite R.M.H., Thompson J.A., Bandeira D.A., Herrmann G.P., Moreira E.C. & Gonçalves V.S.P. 2007. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba, Brazil. *Arqs. Inst. Biol, São Paulo.* 74(3):185-190.
- Langoni H., Meireles L.R., Gottschalk S., Cabral K.G. & Silva A.V. 2000. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. *Arqs Inst. Biol, São Paulo.* 67(1):37-41.
- Moreira E.C. 1994. Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 93p.
- Niang M., Will L.A., Kane M., Diallo A.A., Hussain M. 1994. Seroprevalence of leptospiral antibodies among dairy cattle kept in communal corrals in periurban areas of Bamako, Mali, West Africa. *Prev. Vet. Med.*18:259-265.
- Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van Der Hoofd C.M. & Graat E.A.M. 1997. *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. Wageningen Press, Wageningen. 445p.
- Oliveira F.C.S., Azevedo S.S., Pinheiro S.R., Viegas S.A.R.A., Batista C.S.A., Coelho C.P. , Moraes Z.M., Souza G.O., Gonçalves A.P., Almeida C.A.S. & Vasconcellos S.A. 2009. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. *Arqs. Inst. Biol., São Paulo.* 76(4):539-546.
- Paraná. 2001. Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal: manual de procedimentos: estudo soropidemiológico da brucelose bovina e bubalina. Departamento da Fiscalização, Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento, Brasília. 21p.
- Pellegrin A.O., Guimarães P.H.S., Sereno J.R.B., Figueiredo J.P., Lage A.P., Moreira E.C. & Leite R.C. 1999. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal mato-Grossense. Comunicado Técnico 22, Embrapa Pantanal, Corumbá. 1-9.
- Prescott J. F., Miller R. B., Nicholson V. M., Martin S. W. & Lesnick T. 1988. Seroprevalence and Association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontário. *Can. J. Vet. Res.* 52:210-215.
- Rodrigues C.G., Müller E.E., Freitas J.C. 1999. Leptospirose bovina: sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria.* 29(2):309-314.
- Tocantins S. 2007. Distribuição espacial da prevalência de aglutininas antileptospira em bovinos em Váceres, MT, Brasil, 2005. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 81p.
- 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. 2006. 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. *Prev. Vet. Med.* 76:290-301.

Thrusfield M. 1995. *Veterinary Epidemiology*. 2nd ed. Blackwell Science, Cambridge. 479p.

SPSS INC. 1999a. *SPSS Base 9.0 User's Guide*, Chicago. 740p

Vasconcellos S.A., Barbarini Junior B, O., Umehara O., Morais Z.M., Cortez A., Pinheiro S.R., Ferreira F., Favero A.C.M. & FERREIRA NETO J.S. 1997. 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. *Arqs. Inst. Biol.*, São Paulo. 64(2):7-15.

**Quadro 1** – Prevalência aparente de focos de leptospirose estratificada por tipo de exploração zootécnica da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.

Sistemas de exploração*1	Propriedades amostradas	Propriedades positivas	Prevalência	
			%	IC 95%*2
Corte	64	52	81,25	[69,54-89-92]
Leite	101	62	61,39	[51,18-70,91]
Misto	107	66	61,68	[51,78-70,92]
Região	274	181	66,06	[60,12-71,65]

\*1 Duas propriedade não informaram o sistema de exploração

\*2 Intervalo de confiança de 95%

**Quadro 2** – Sorovares de *Leptospira* spp prevalentes nas propriedades positivas da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.

Sorovar	Proporção de propriedades positivas	Prevalência (%)
Hardjo	99/181	54,70
Grippotyphosa	14/181	7,74
Shermani	13/181	7,18
Tarassovi	05/181	2,76
Sentot	05/181	2,76
Hardjo e Wolffi	03/181	1,66
Autumnalis	03/181	1,66
Australis	03/181	1,66
Bratislava	02/181	1,10
Wolffi	01/181	0,55
Outros	33/181	18,23

**Quadro 3** – Distribuição das variáveis analisadas associadas à infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.

Variável	Expostos/Positivos	Expostos/Negativos	P
Rebanho confinado/semi-confinado	197/1.068	197/844	0,009
Exploração de corte	260/1.068	78/850	0,000
Raças puras	411/1.039	229/825	0,000
Ter mais de 49 bovinos	424/1.072	67/854	0,000
Ter mais de 20 fêmeas acima de 24 meses	407/1.066	63/847	0,000
Utiliza a inseminação artificial	168/1.044	200/834	0,000
Contato com ovinos e caprinos	182/1.072	79/854	0,000
Contato com equinos	810/1.072	445/854	0,000
Contato com suínos	707/1.072	602/854	0,034
Contato com cães	964/1.072	779/854	0,337
Contato com animais silvestres	346/1.072	194/854	0,000
Histórico de aborto	225/1.053	130/833	0,001
Deixa produtos de aborto na pastagem	346/787	270/534	0,000
Compra de animais para reprodução	615/1.066	286/846	0,000
Venda de animais para reprodução	308/1.060	121/841	0,000
Abate animais na propriedade	109/1.053	290/830	0,000
Aluga pasto	189/1.068	63/845	0,000
Pasto comum com outras propriedades	164/1.065	84/848	0,000
Presença de áreas alagadiças	256/1.064	226/836	0,139
Presença de piquetes de parição	345/1.064	165/826	0,000

**Quadro 4** – Distribuição das variáveis analisadas associadas à infecção pelo sorovar Hardjo em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.

Variável	Expostos/Positivos	Expostos/Negativos	P
Rebanho confinado/semi-confinado	09/99	15/92	0,133
Exploração de corte	37/98	12/91	0,001
Raças puras	51/94	35/87	0,059
Ter mais de 43 bovinos	46/99	09/92	0,000
Ter mais de 18 fêmeas acima de 24 meses	45/98	11/92	0,000
Utiliza a inseminação artificial	12/99	18/89	0,036
Contato com ovinos e caprinos	28/99	07/92	0,000
Contato com equinos	85/99	56/92	0,000
Contato com suínos	66/99	64/92	0,668
Contato com cães	92/99	87/92	0,642
Contato com animais silvestres	55/99	42/92	0,171
Histórico de aborto	23/96	10/90	0,222
Deixa produtos de aborto na pastagem	36/61	20/47	0,236
Compra de animais para reprodução	69/99	33/91	0,000
Venda de animais para reprodução	25/99	10/92	0,010
Abate animais na propriedade	07/98	29/92	0,000
Aluga pasto	28/98	05/91	0,028
Pasto comum com outras propriedades	30/99	15/90	0,028
Presença de áreas alagadiças	23/99	22/89	0,811
Presença de piquetes de parição	33/98	20/92	0,067

**Quadro 5** – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados à infecção para qualquer sorovar de *Leptospira* spp em rebanhos com atividade reprodutiva da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.

Variáveis	Casos	Expostos	p	OR <sup>1</sup>	IC 95%
Presença de > 43 bovinos	61	70	0,005	3,120	[1,418-6,867]
Compra reprodutores	108	142	0,014	2,010	[1,154-3,500]
Aluguel de pasto	38	43	0,038	2,925	[1,060-8,068]
Presença de piquete de parição	69	89	0,030	1,981	[1,068-3,676]

R<sup>2</sup> = 17,8%

<sup>1</sup>Odds ratio

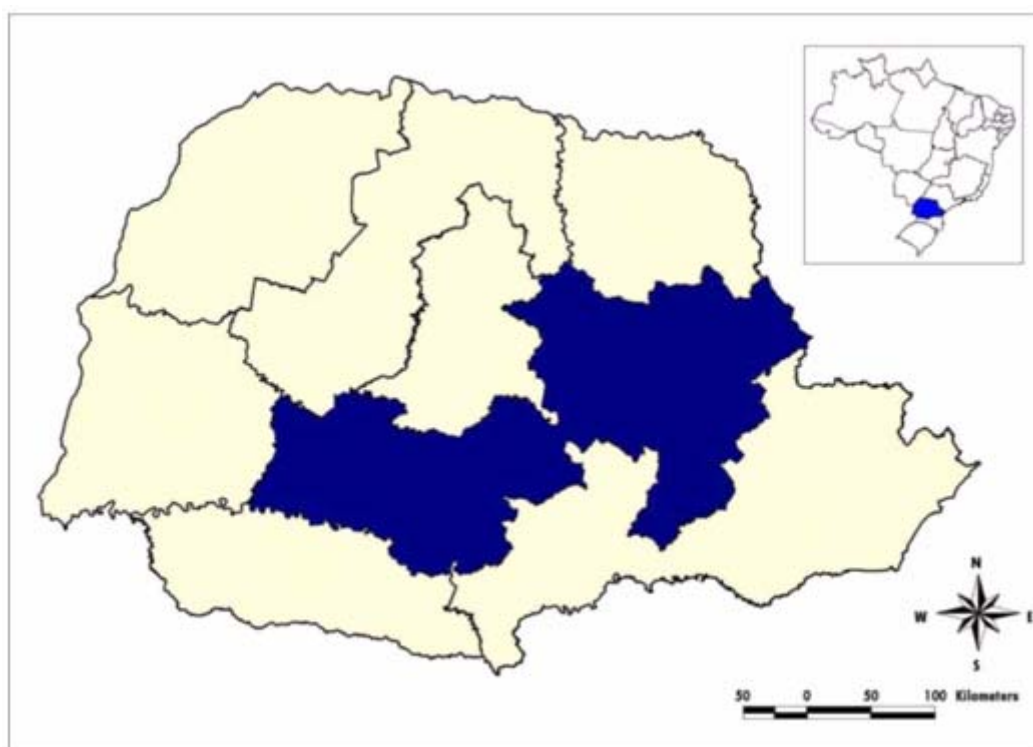
**Quadro 6** – Modelo final de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados à infecção pelo sorovar Hardjo em rebanhos com atividade reprodutiva da região centro-sul do estado do Paraná. Colheitas efetuadas em 2001 a 2002.

Variáveis	Casos	Expostos	p	OR <sup>1</sup>	IC 95%
Presença de > 43 bovinos	46	55	0,004	3,622	[1,512-8,677]
Compra reprodutores	69	102	0,001	3,143	[1,557-6,342]
Aluguel de pasto	28	33	0,012	4,070	[1,370-2,087]
Presença de eqüinos	85	141	0,009	2,981	[1,321-6,726]

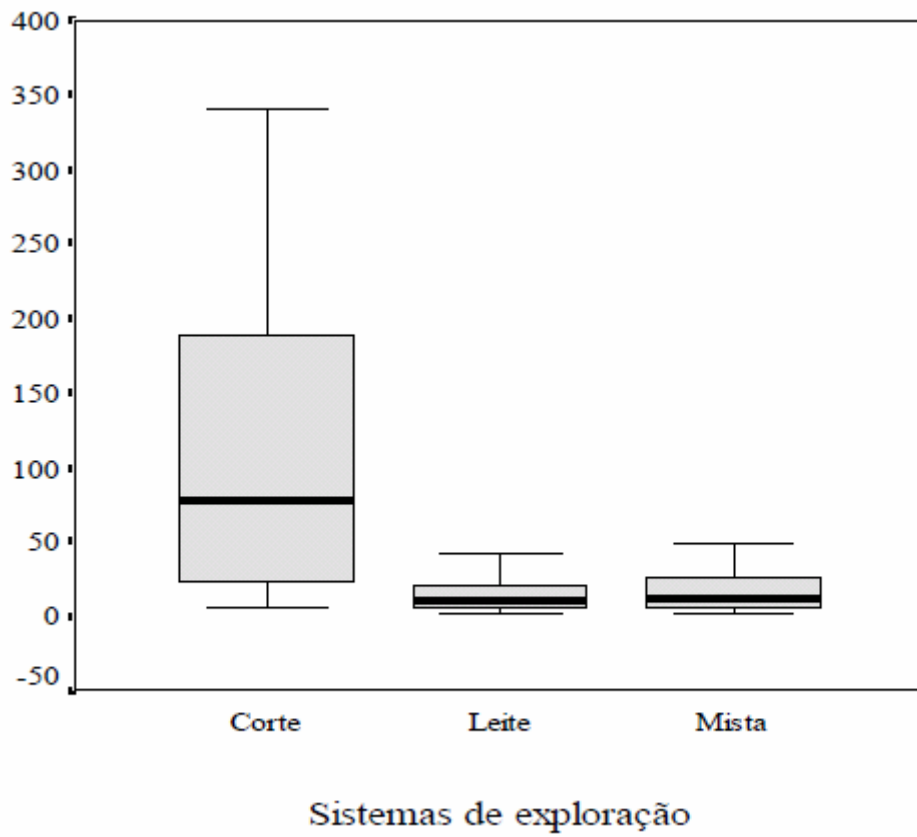
R<sup>2</sup> = 35,4%

<sup>1</sup>Odds ratio

**Fig.1** – Mapa do estado do Paraná demonstrando a região centro-sul, alvo do presente estudo.



**Fig.2** –Diagrama de blocos mostrando a dispersão do tamanho dos rebanhos de acordo com o sistema de exploração na região centro-sul do estado do Paraná.



## 5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

### 5.1 MONITORAMENTO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE UM REBANHO BOVINO DE LEITE NATURALMENTE INFECTADO PELA *LEPTOSPIRA* SPP<sup>1</sup>

Trabalho.....

#### **Monitoramento sorológico e molecular de um rebanho bovino de leite naturalmente infectado pela *Leptospira* spp**

**ABSTRACT - [Serological and molecular monitoring of a dairy cattle herd naturally infected with *Leptospira* spp.]** Monitoramento sorológico e molecular de um rebanho bovino de leite naturalmente infectado pela *Leptospira* spp. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid 380, Cx. Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brazil. E-mail:freitasj@uel.br

The aim of this study was to perform serological and molecular monitoring and isolate leptospires in urine samples from a dairy cattle herd naturally infected with *Leptospira* spp, consisting of 50 cows in reproductive age, located in north region of Paraná state. The animals had a history of abortions and infertility and had not been vaccinated against leptospirosis. Among november/2009 to april/2011, were performed five blood and urine collections at regular intervals of four months. To perform microscopic agglutination test (MAT), blood samples were collected from 50 females of the herd. Among these, were collected urine samples from 20 cows with antibody titles > 100 in MAT to perform n-PCR and culture for bacterial isolation. Additionally, two urine collections were performed in five animals with antibody titles < 100 in MAT to perform n-PCR. The amplified products in n-PCR were sequenced and the identity of the sequences were compared to those deposited in GeneBank, using BLAST program. The serological profile of the evaluated animals considered serovar Hardjo as the most probably in all serum samples tested and the titles detected ranged from 20 to 1600. In all urine collections performed, the presence of positive animals in n-PCR were confirmed. The n-PCR technique was capable of detecting leptospires in urine from animals that had antibody titles > 100 and < 100 in MAT. Urine samples seeded showed no growth of *Leptospira* spp in evaluations performed weekly. The sequencing performed identified 100% homology with *Leptospira interrogans*. This study suggests that serovar Hardjo may be considered the most probably serovar circulating in the herd and the cause of the reproductive problems in the animals studied. The results obtained show that the minimum titles considered positives (> 100) in serology of infected cattle, mainly to serovar Hardjo may fail to detect animals positive for leptospirosis. The establishment of other titles as cutoff points for this serovar in MAT and the use of n-PCR can be considered, particularly for the identification of renal carriers, which would allow better control of bovine leptospirosis.

**INDEX TERMS:** Monitoring. Microscopic agglutination test. Nested-PCR. Culture. Leptospirosis.

<sup>1</sup> Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico **Pesquisa Veterinária Brasileira**, disponível em <http://www.pvb.com.br/>

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi realizar o acompanhamento sorológico e molecular e isolar leptospiras em amostras de urina de um rebanho bovino de leite naturalmente infectado pela *Leptospira* spp, constituído por 50 fêmeas em idade reprodutiva, localizado na região norte do estado do Paraná. Os animais apresentavam histórico de abortamentos e infertilidades e não haviam sido vacinados contra a leptospirose. Entre novembro/2009 a abril/2011, foram realizadas cinco coletas de sangue e urina em intervalos regulares de quatro meses. Para a realização da prova de soroglutinação microscópica (SAM), foram colhidas amostras de sangue das 50 fêmeas do rebanho. Dentre estas, foram colhidas amostras de urina de 20 fêmeas com títulos de anticorpos > 100 na SAM para a realização da n-PCR e cultura para isolamento bacteriano. Adicionalmente, duas coletas de urina foram realizadas em cinco animais que apresentaram títulos de anticorpos < 100 na SAM para a realização da n-PCR. Os produtos amplificados na n-PCR foram sequenciados e a identidade das sequências foram comparadas com as depositadas no GeneBank, utilizando o programa BLAST. O perfil sorológico dos animais avaliados considerou o sorovar Hardjo como o mais provável em todas as amostras de soros testadas, com títulos variando entre 20 e 1600. Em todas as coletas de urina realizadas, foi constatada a presença de animais positivos na n-PCR. A técnica de n-PCR foi capaz de detectar o DNA de leptospiras na urina de animais que apresentaram títulos de anticorpos > 100 e < 100 na SAM. As amostras de urina semeadas não apresentaram crescimento de *Leptospira* spp nas avaliações realizadas semanalmente. O sequenciamento realizado identificou 100% de homologia com a *Leptospira interrogans*. Este trabalho sugere que o sorovar Hardjo pode ser considerado como o provável sorovar circulante no rebanho e o causador dos problemas reprodutivos dos animais estudados. Os dados obtidos demonstram que os títulos mínimos considerados positivos (> 100) na sorologia de bovinos infectados, principalmente para o sorovar Hardjo podem falhar em detectar animais positivos para a leptospirose. Este trabalho demonstrou que o estabelecimento de outros títulos como ponte de corte para este sorovar na SAM e a utilização da n-PCR podem ser considerados, principalmente para a identificação de animais portadores renais, o que possibilitaria o melhor controle da leptospirose bovina.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Monitoramento. Soroglutinação microscópica. Nested-PCR. Cultura. Leptospirose.

### 5.1.1 Introdução

A leptospirose bovina é responsável por elevadas perdas econômicas na pecuária mundial, comprometendo o desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos, causando abortamento, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos, repetição de cio e infertilidade (Ellis 1994, Health & Johnson 1994, Faine et al. 1999).

Muitos são os sorovares envolvidos na leptospirose bovina, entretanto o sorovar Hardjo é considerado o mais frequente em todo o mundo e o causador de maior impacto na eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos infectados (Bolin et al. 1989, Castro et al. 2008, Figueiredo et al. 2009, Hashimoto et al. 2010). Nestes rebanhos, a disseminação de leptospiras é caracterizada principalmente pela presença de animais infectados ou

portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina de forma intermitente por longos períodos, mantendo a doença endêmica no rebanho (Ellis 1994).

Dentre os métodos laboratoriais, a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) é a mais utilizada para o diagnóstico da leptospirose (Faine et al., 1999). No entanto, resultados sorológicos negativos obtidos na SAM não excluem a possibilidade do animal ser portador renal, tornando-se necessária a utilização de outros métodos laboratoriais que visem o melhor controle da enfermidade (Langoni et al. 2008).

O isolamento da *Leptospira* spp é considerada a técnica definitiva no diagnóstico da leptospirose bovina, entretanto é laboriosa e restrita a poucos laboratórios (Levett 2001). Atualmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada de forma crescente no diagnóstico da leptospirose bovina, permitindo amplificar quantidades mínimas do DNA do micro-organismo em diferentes tipos de amostras biológicas, principalmente na urina (Magajevski et al. 2005, Bonfim & Koury 2006).

O objetivo deste trabalho foi realizar o acompanhamento sorológico e molecular e isolar leptospiras em amostras de urina de fêmeas bovinas em idade reprodutiva, naturalmente infectadas pela *Leptospira* spp, provenientes de um rebanho de leite localizado na região norte do estado do Paraná.

## 5.1.2 Material e Métodos

### 5.1.2.1 Animais utilizados

O estudo foi realizado na região norte do estado do Paraná em um rebanho bovino constituído por 50 fêmeas da raça Jersey em idade reprodutiva, criadas em regime extensivo. Os animais apresentavam histórico de abortamentos e infertilidade e não haviam sido vacinados contra a leptospirose.

### 5.1.2.2 Coleta de amostras

Entre novembro/2009 a abril/2011, foram realizadas cinco coletas de sangue e urina em intervalos regulares de quatro meses.

Para a realização da prova de soroaglutinação microscópica (SAM), foram colhidas amostras de sangue das 50 fêmeas do rebanho. Dentre estas, foram colhidas amostras de urina de 20 fêmeas com títulos de anticorpos > 100 na SAM para a realização da n-PCR e

cultura para isolamento bacteriano. Adicionalmente, duas coletas de urina foram realizadas em cinco animais que apresentaram títulos de anticorpos  $< 100$  na SAM para a realização da n-PCR.

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção da veia jugular utilizando agulha descartável estéril e tubo com vácuo, previamente identificado. As amostras de soro foram armazenadas em microtubos de plástico e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da técnica de SAM.

A urina foi obtida após massagem da região do períneo, desprezando-se a primeira parte da micção e acondicionando-a em frasco estéril.

### 5.1.2.3 SAM

Para detectar anticorpos contra *Leptospira* spp, todos os soros foram submetidos à SAM com antígenos vivos (Faine et al. 1999). Foram utilizados 22 sorovares de referência: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcomb, Cynopteri, Fortbragg, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Sentot e Tarassovi. Os antígenos foram mantidos a  $28^{\circ}\text{C}$  por 5 a 10 dias em meio EMJH (DIFCO®-USA).

Todos as amostras de soro foram diluídas inicialmente a 1:50 em solução tampão salina fosfato estéril (PBS) com pH 7,4 e a essas foi acondicionado a mesma quantidade de antígeno, também previamente diluído em PBS, obtendo-se a diluição final de 1:100. Todos os soros que apresentaram 2+ ou mais de aglutinação na diluição 1:100 foram considerados reagentes (Myers 1985). Os soros reagentes foram diluídos seriadamente e examinados até a determinação da diluição máxima positiva. Outra alíquota mantida congelada dos soros não reagentes na diluição 1:100 foram novamente diluídos a 1:20, 1:40 e 1:80 (Chappel et al. 1992). A análise dos resultados considerou como mais provável, o sorovar que apresentou o maior título. Os animais que apresentaram títulos mais elevados idênticos para dois ou mais sorovares foram excluídos desta análise e considerados reatores para a *Leptospira* spp.

#### 5.1.2.4 Cultura de *Leptospira* spp

Para o isolamento, as amostras de urina colhidas foram imediatamente semeadas, ainda na propriedade, em tubos contendo meio EMJH (Difco® - USA) acrescido de antibióticos: 5-fluoruracil (400 mg/L; Sigma® -USA) (Heer et al. 1982) , cloranfenicol (5 mg/L; Sigma® -USA) , ácido nalidíxico (50 mg/L; Inlab®-BR), neomicina (10 mg/L; Sigma® -USA) e vancomicina (10 mg/L; Acros® - USA) (Schönberg 1981), transportadas ao laboratório e então incubadas a 28°C por 24 h. Após este período, uma subcultura de cada tubo semeado foi realizada, em duplicata, para os meios EMJH (Difco® - USA) sem a adição de antibióticos e avaliadas semanalmente, por até seis meses em microscópio de campo escuro (Olimpus-Modelo Bx40).

#### 5.1.2.5 Nested-PCR

Após a semeadura da urina, as amostras foram aliquotadas em eppendorf®, acondicionadas imediatamente sob refrigeração em caixas térmicas e transportadas ao laboratório.

" Após a chegada ao laboratório, 1 mL das amostras de urina foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 300 [iL do sobrenadante e a extração do DNA da leptospira foi realizada a partir destes 300[iL como descrito na técnica de sílica/tiocionato de guanidina (Boom et al. 1990). Amostras de controle negativo (água ultrapura autoclavada) e amostra de controle positivo (sorovar Hardjo) foram incluídas em todos os procedimentos.

Para a realização da PCR foram utilizados os primers lipL32 F: 5' CGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGT 3' e lipL32 R: 5' CTCACCGATTTCGCCTGTTGGG 3', desenhados para amplificar um produto de 264 pb entre as posições 73 e 336 da região que codifica a lipoproteína lipL32. A nested-PCR (n-PCR) foi realizada utilizando os primers *lipL32* R1: 5' CTCCATTTCAGCGATTACGG 3' e *lipL32* F2: 5' TTCTGAGCGAGGACACAATCCC 3', que amplificam um produto de 183 pb da primeira amplificação (Jouglard et al. 2006). A técnica de PCR e n- PCR foi realizada conforme descrito por Jouglard et al. (2006). As reações foram realizadas em termociclador modelo TC 312, marca Techne®. Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de etídeo (0,5 [ig/mL), em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), visualizados e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

#### 5.1.2.6 Sequenciamento

Os produtos amplificados pela PCR foram purificados com o GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), quantificados em Qubit™ Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA) e analisados em gel de agarose a 2%. O sequenciamento foi realizado em MegaBACETM 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequence, Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase com DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), utilizando os primers forward e reverse da n-PCR. A qualidade das sequências foi analisada pelo programa Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências consensuais foram obtidas pelo software CAP3 e a identidade comparada com todas as sequências depositadas no GeneBank utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 5.1.3 Resultados

No quadro 1, estão apresentados os resultados dos exames sorológicos e da n-PCR realizada nas amostras de urina colhidas das fêmeas bovinas estudadas. O sorovar Hardjo foi considerado o mais provável em todas as amostras de soros avaliadas e os títulos detectados variaram entre 20 e 1600.

No quadro 2, estão apresentados os resultados da n-PCR realizada nas amostras de urina colhidas das cinco fêmeas bovinas com títulos de anticorpos < 100 para o sorovar Hardjo.

As amostras de urina semeadas não apresentaram crescimento de *Leptospira* spp nas avaliações realizada semanalmente.

O sequenciamento realizado identificou 100% de homologia com a *Leptospira interrogans*.

#### 5.1.4 Discussão

Inquéritos sorológicos realizados em bovinos demonstram que a infecção por *Leptospira* spp está amplamente difundida no Brasil (Homem et al. 2001, Castro et al. 2008, Figueiredo et al. 2009, Hashimoto et al. 2010). O sorovar Hardjo é considerado o mais frequente nesta espécie animal e tem sido reportado como importante causador de

abortamentos e infertilidades em rebanhos bovinos sororeagentes (Langoni et al. 1999, Homem et al. 2001, Lilenbaum; Souza 2003).

Apesar da cultura bacteriológica ser considerada a técnica definitiva no diagnóstico da leptospirose, neste trabalho não foi possível isolar a *Leptospira* spp, entretanto os resultados obtidos da n-PCR e do sequenciamento realizados com o primer LipL32 confirmaram a presença do micro-organismo na urina dos animais estudados.

O sorovar Hardjo foi considerado o mais provável nos exames sorológicos realizados, sugerindo que este poderia ser o provável sorovar circulante no rebanho e o causador dos problemas reprodutivos nos animais estudados. Foram detectados títulos de 1600 para este sorovar em poucos animais (Quadro 1), concordando com Kirkbride (1990), que afirmou que títulos de anticorpos para o sorovar Hardjo são geralmente baixos, sendo raramente superiores a 800. Segundo Ellis et al. (1982) e Bolin et al. (1991), o sorovar Hardjo é considerado um antígeno de baixa imunogenicidade, produzindo títulos baixos de anticorpos e por curto período de tempo. Títulos de anticorpos < 100 contra o sorovar Hardjo, como os detectados neste trabalho, já foram relatados por Dhaliwal et al. (1996). Estes autores demonstraram, através do monitoramento de infecção experimental em novilhas pelo sorovar Hardjo, que títulos significativos (>100) na SAM foram mantidos por uma ou duas semanas e depois declinaram para 10 ou 30.

De acordo com Ellis (1984), as flutuações nos títulos de anticorpos no decorrer do tempo podem ser atribuídas a diversos fatores, como as espécies animais de contato, os sorovares existentes, as condições ambientais e climáticas, além do manejo e das oportunidades de infecção direta e indireta. Geralmente, a infecção por *Leptospira* spp é caracterizada pelo declínio de títulos de anticorpos com o tempo (Bolin 2003). Entretanto, o aumento gradual dos títulos observado neste estudo pode estar relacionado com as práticas de manejo realizadas na propriedade. Os animais estudados eram criados em regime extensivo, entretanto, confinados em um único e pequeno piquete durante a ordenha. A maior concentração de animais no piquete e o conseqüente acúmulo de urina contaminada pela *Leptospira* spp, associadas às falhas de manejo, poderia aumentar as chances de contato dos animais com o micro-organismo, causando um estímulo antigênico e conseqüentemente ao aumento dos títulos de anticorpos.

Em todas as coletas de urina realizadas, foi constatada a presença de pelo menos um animal positivo na n-PCR (Quadros 1 e 2), os quais poderiam atuar como fontes de infecção constante da *Leptospira* spp para os animais suscetíveis, mantendo a infecção no rebanho estudado. A alta porcentagem de animais que apresentaram resultados positivos na n-

PCR pode ser atribuída ao tipo de manejo realizado na propriedade, que propicia a disseminação da enfermidade no ambiente. A n-PCR é considerada por diversos autores como uma técnica sensível e específica que tem sido utilizada para detectar leptospiras em amostras de urina de animais e humanos com suspeita clínica de leptospirose (Nassi et al. 2003, Jouglard et al. 2006). Entretanto, a sensibilidade da técnica pode variar de acordo com o primer selecionado. Os primers utilizados neste estudo amplificam pela nested-PCR um fragmento altamente conservado de DNA que codifica a lipoproteína LipL32, considerada a principal lipoproteína da membrana externa de leptospiras patogênicas e importante fator de virulência, que encontra-se ausente em espécies não patogênicas.

Resultados negativos na n-PCR podem ser decorrentes da eliminação intermitente de leptospiras pela urina (Faine 1982) ou ainda devido à presença de substâncias inibidoras presentes na própria urina e ao congelamento da amostra antes de proceder a extração do DNA, os quais podem provocar a lise das leptospiras e como resultado, o DNA ser perdido com o sobrenadante após a centrifugação realizada (Lucchesi et al. 2004). Neste trabalho, o processamento das amostras de urina foi realizado imediatamente após o seu transporte ao laboratório, para evitar a degradação do ácido nucléico da bactéria que poderia ocorrer durante o congelamento. Estes fatores, associados à eliminação intermitente de leptospiras pela urina poderiam justificar alguns dos resultados obtidos na n-PCR.

A técnica de n-PCR empregada foi capaz de detectar o DNA de leptospiras na urina de bovinos que apresentaram títulos de anticorpos  $< 100$  na SAM, o que demonstra a importância da condição de portadores renais destes animais, que poderiam eliminar e disseminar leptospiras para outros animais contactantes e também para o homem mesmo com a ausência de títulos considerados positivos na SAM (Santa Rosa et al. 1973). Ellis et al. (1981) não conseguiram detectar títulos de anticorpos para o sorovar Hardjo em 19,60% dos animais comprovadamente portadores renais de leptospiras. Estes dados demonstram que o título mínimo considerado positivo ( $>100$ ) na sorologia de bovinos infectados, principalmente para o sorovar Hardjo, pode falhar em detectar animais positivos para a leptospirose.

Estudos epidemiológicos da leptospirose nos rebanhos bovinos são de grande importância, pois contribuem para o monitoramento da saúde animal, viabilizando o controle da infecção e minimizando as perdas recorrentes. Entretanto, a maioria dos estudos conduzidos sobre a leptospirose bovina é realizada de forma pontual, sem o acompanhamento da evolução da infecção no rebanho. No presente trabalho, o acompanhamento dos animais durante 540 dias teve como objetivo monitorar os títulos de anticorpos e estudar a eliminação de leptospiras pela urina. Demonstrou-se que a utilização da SAM, utilizando como ponto de

corte 1:100, pode não ser um indicador adequado para diagnosticar a leptospirose em bovinos infectados pelo sorovar Hardjo. Este trabalho demonstrou que o estabelecimento de outros títulos como ponte de corte para o sorovar Hardjo na SAM e a utilização da n-PCR podem ser considerados, principalmente para a identificação de animais portadores renais, o que possibilitaria o melhor controle da leptospirose bovina.

#### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado.

#### Referências

- Bolin C.A., Zuerner R.L. & Trueba G. 1989. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis in bovine urine. Am. J. Vet. Res. 50: 1001-1003.
- Bolin C.A., Cassels J.A., Zuerner R.L. & Trueba G. 1991. Effect of vaccination with monovalent *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis vaccine on type Hardjo-bovis infection of cattle. Am. J. Vet. Res. 52:1639-1643.
- Bolin C.A. 2003. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. Proceedings of the 6<sup>th</sup> Western Dairy Management Conference. Reno, N.V-155.
- Bonfim M.R.Q. & Koury M.C. 2006. Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. Vet. Microbiol. 118: 278-288.
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-Van Dillen P.M. & Van Der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.
- Castro V., Azevedo S.S., Gotti T.B., Batista C.S.A., Gentili J., Moraes Z.M., Souza G.O., Vasconcellos S.A., M.E & Genovez M.E. 2008. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. Arqs. Inst. Biol, São Paulo. 75(1):3-11.
- Chappel R.J., Ellia W.A., Adler B., Amon L., Millar B.D., Zhu S.S. & Prime R.W. 1992. Serological evidence for the presence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava in Australian pigs. Aus. Vet. J. 69: 119-120.
- Dhaliwal G.S., Murray R.D. & Ellis W.A. 1996. Reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo relative to the year of diagnosis. Vet. Rec. 138: 272-276.
- Ellis W.A., O'Brien J.J. & Cassels J. 1981. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype Hardjo infection in Northern Ireland. Vet. Rec. 108: 555-557. Ellis W.A.,

- O'Brien J.J., Nelly S.D. & Hanna J. 1982. Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. *Vet. Rec.* 110: 178-180.
- Ellis W.A. 1984. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Prev. Vet. Med.* 2: 411-421.
- Ellis W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North. Am: Food An Prac.* 10: 463-478.
- Faine S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization Offset Publication[67]. Geneva.
- Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2th ed. Medical Science, Melbourne, Australia. 272p.
- Figueiredo A.O., Pellegrin A.O., Gonçalves V.S.P., Freitas E.B., Monteiro L.A.R.C., Oliveira J.M. & Osório A.L.A.R. 2009. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 29(5):375-381.
- Hashimoto V.Y., Garcia J.L., Spohr K.A.H., Silva F.G., Alves L.S. & Freitas J.C. 2010. Prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos, caninos, equinos, ovinos e suínos do município de Jaguapita, estado do Paraná, Brasil. *Arqs. Inst. Biol.* 77: 521-524.
- Health S.E. & Johnson R. 1994. Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205: 1518-1523.
- Heer S., Riley A.E., Nesor J.A., Roux D. & De Lange J.F. 1982. *Leptospira interrogans* serovar Pomona associated with abortion in cattle: isolation methods and laboratory animal histopathology. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 49: 57-62.
- Homem V.S.F., Heinemann M.B., Moraes Z.M., Vasconcellos S.A., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2001. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. *Revta. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(2):173-180.
- Jouglard SDD., Simionatto S., Seixas FK., Nassi FL. & Dellagostin AO. 2006. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Can. J. Microbiol.* 52: 747:752. Kirkbride C.A. 1990. *Laboratory Diagnosis of Livestock abortion.* Ames: State University Press. 3:59-65.
- Langoni H., Souza L.C., Silva A.V.; Luvizotto M.C.R.; Paes A.C. & Lucheis S.B. 1999. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 40:271-275.
- Langoni H., Souza L.C., Da Silva A.V., Cunha E.L.P. & Silva R.C. 2008. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of *anti-Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 45: 190-199.
- Levett P.N. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microb. Rev.* 14: 296-326.
- Lilenbaum W. & Souza G.N. 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 75: 249-251.

Lucchesi P.M., Arroyo G. H., Etcheverria A. I., Parma A. E. & Seijo A. C. 2004. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37: 131-134.

Magajevski F.M., Girio R.J.S., Mathias L.A., Myashiro S., Genovez M.E. & Scarcelli E.P. 2005. Detection of *Leptospira* pp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Braz. J. Microb.* 36: 334-437.

Myers D.M. 1985. Manual de métodos para El diagnóstico de laboratorio de La leptospirosis. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis.

Myers D.M. 1985. Manual de métodos para El diagnóstico de laboratorio de La leptospirosis. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis.

Nassi F.L., Seixas F.K., Jouglard S.D., Simionatto S., Silva E.F., Seyffert N., Brod C.S. & Dellagostin O.A. 2003. Leptospirosis diagnosis using neted PCR. *Braz. J. Microb.* 34: 90-92.  
Santa Rosa C.A., Camdelli Filho O. & Castro A.F.P. 1973. Suínos como reservatório de leptospiras no Brasil. *Arqs. Inst. Biol.* 40: 243:246.

Shönberg A. 1981. Studies on the effect of antibiotics substances on leptospiras and their cultivation from material with a high bacterial count. *Zent Bakt Parasit Infekt Hyg.* 249:400-406.

**Quadro 1** – Resultados dos exames sorológicos e da n-PCR realizada em amostras de urina colhidas de fêmeas bovinas provenientes de uma propriedade rural localizada na região norte do estado Paraná, 2012.

Animal	1° coleta (novembro/09)		2° coleta (março/10)		3° coleta (julho/10)		4° coleta (novembro/10)		5° coleta (março/11)	
	SAM	n-PCR	SAM	n-PCR	SAM	n-PCR	SAM	n-PCR	SAM	n-PCR
1	400	+	100	+	200	+	800	+	400	-
2	800	-	100	-	100	-	400	+	100	+
3	800	-	100	-	200	-	400	-	400	-
4	400	+	100	+	Abatida	Abatida	Abatida	Abatida	Abatida	Abatida
5	800	+	200	+	100	-	Abatida	Abatida	Abatida	Abatida
6	1600	+	400	-	1600	-	800	+	800	+
7	800	+	100	+	200	-	200	+	Abatida	Abatida
8	400	-	100	+	100	+	200	-	Abatida	Abatida
9	400	-	80	-	200	+	100	+	100	-
10	800	+	200	-	800	+	1600	+	400	-
11	400	-	80	-	100	+	100	+	100	-
12	1600	-	200	-	400	+	800	-	800	-
13	200	-	100	+	200	-	80	-	200	-
14	400	-	80	-	200	+	100	-	100	-
15	1600	-	200	-	100	-	400	-	200	-
16	400	-	100	-	400	-	100	+	400	-
17	400	-	80	-	200	+	100	+	100	+
18	800	-	200	-	400	-	800	+	200	-
19	200	-	80	-	100	+	100	+	100	-
20	200	-	200	-	100	-	100	-	80	-
21	100		100		100		100		100	
22	200		100		100		100		80	
23	40		40		80		20		20	
24	80		80		80		100		100	
25	400		100		200		200		400	
26	80		80		100		100		100	
27	40		40		40		80		80	
28	80		80		80		100		80	
29	80		100		100		100		80	
30	40		40		40		100		80	
31	20		20		40		80		80	
32	200		100		400		100		200	
33	80		80		100		20		80	
34	200		200		800		100		100	
35	40		200		400		100		100	
36	100		100		100		100		80	
37	80		80		100		100		80	
38	200		100		100		100		80	
39	20		20		20		40		40	
40	80		80		80		100		80	
41	100		100		100		200		200	
42	200		100		200		200		200	
43	20		40		40		40		40	
44	100		100		100		100		200	
45	80		80		100		100		80	
46	400		100		200		400		200	
47	800		400		200		200		400	
48	100		80		80		100		80	
49	200		80		80		100		80	
50	50		80		100		100		80	

**Quadro 2** – Resultados da n-PCR realizada em amostras de urina colhidas de cinco fêmeas bovinas com títulos de anticorpos < 100 para o sorovar Hardjo, provenientes de uma propriedade rural localizada na região norte do estado do Paraná, 2012.

Animal	1° coleta (novembro/10)		2° coleta (março/11)	
	SAM	n-PCR	SAM	n-PCR
23	20	-	20	-
27	80	-	80	+
31	80	-	80	-
39	40	-	40	-
43	40	+	40	-

## CONCLUSÕES

- A análise de prevalência de focos e de animais demonstrou que a leptospirose está presente em todos os sete circuitos produtores do estado do Paraná.
- As variáveis relacionadas à característica da população animal e ao manejo zootécnico dos rebanhos estão associadas à soropositividade a *Leptospira* spp e sorovar Hardjo no estado do Paraná.
- O sorovar Hardjo, o mais frequente entre os animais e rebanhos bovinos analisados do estado do Paraná, pode ser considerado o causador dos problemas reprodutivos nas fêmeas bovinas de leite monitoradas sorologicamente e molecularmente na propriedade estudada.
- Títulos mínimos considerados positivos ( $> 100$ ) na sorologia de bovinos infectados, principalmente para o sorovar Hardjo podem falhar em detectar animais positivos para a leptospirose.
- O estabelecimento de outros títulos como ponto de corte para o sorovar Hardjo na SAM e a utilização da n-PCR podem ser considerados, principalmente para a identificação de animais portadores renais, o que possibilitaria o melhor controle da leptospirose bovina.