

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

**DETERMINAÇÃO DA SOROPOSITIVIDADE PARA LEPTOSPIROSE
EM OVINOS**

SEBASTIANA ADRIANA PEREIRA SOUSA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Produção Animal

**ARAGUAÍNA
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

DETERMINAÇÃO DA SOROPOSITIVIDADE PARA LEPTOSPIROSE EM OVINOS

SEBASTIANA ADRIANA PEREIRA SOUSA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Katyane de Sousa Almeida

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Baptista

**ARAGUAÍNA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação
Biblioteca UFT - EMZV

S725d Sousa, Sebastiana Adriana Pereira
Determinação da soropositividade para leptospirose em ovinos. /
Sebastiana Adriana Pereira Sousa. -- Araguaína: [s.n.], 2014.
59 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Katyane de Sousa Almeida

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) - Universidade
Federal do Tocantins, 2014.

1. Parasitologia veterinária. 2. Ovinos. 3. Pequenos Ruminantes. 4
Leptospira. 5. Sorologia. I. Título

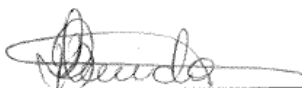
CDD 636.089696

DETERMINAÇÃO DA SOROPOSITIVIDADE PARA LEPTOSPIROSE EM OVINOS

Por

SEBASTIANA ADRIANA PEREIRA SOUSA

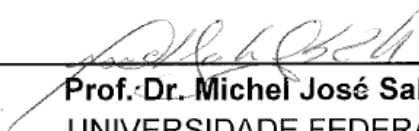
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, tendo sido julgado pela Banca Examinadora formada pelos professores:



Presidente: Prof.^a Dr.^a Katyane de Sousa Almeida
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS



Prof.^a Dr.^a Bruna Alexandrino
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS



Prof.^o Dr. Michel José Sales Abdalla Helayel
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Araguaína, 24 de Fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho aos produtores rurais, aos acadêmicos e profissionais da Medicina Veterinária e da Zootecnia, e a todos os que, direta ou indiretamente, trabalham para a manutenção da saúde e produção animal.

AGRADECIMENTOS

No decorrer do tempo em que estive ligada ao curso de mestrado contei com pessoas muito importantes e que contribuíram, tanto para o desenvolvimento deste trabalho, como principalmente para meu crescimento pessoal. Neste momento, gostaria de prestar meus sinceros agradecimentos a essas pessoas e dizer que sem elas talvez eu não tivesse chegado até aqui.

Primeiramente, agradeço a ajuda daquele sem o qual nada seria capaz de existir, ao nosso Senhor e soberano Jeová Deus, por ter me concedido tantas bênçãos durante toda a minha trajetória. Em segundo, agradeço todo o carinho, o apoio e a compreensão de minha mãe Neuzelina, que sempre se esforçou para fazer de mim uma boa pessoa. Mãe, devo dizer que você é inigualável!!

Agradeço também aos membros da minha família, em especial às minhas tias Rita, Silvia, Loreny e Tereza por terem ocupado um importante papel na minha educação desde criança e por sempre estarem por perto nos momentos em que precisei. Agradeço às primas Eudina, Diva e Eudilene pelas conversas, por dividir os momentos de ansiedade e pela alegria. É com muito amor que sempre agradecerei a vocês.

Agradeço imensamente o apoio e a ajuda braçal dos amigos Nekita Évely e Ronaldo Alves. Nekita, obrigada pela amizade, pela humildade, pelas conversas na hora do almoço, pelos conselhos, e acima de tudo, pela generosidade para comigo durante todo o período experimental do meu trabalho. E o que dizer do Ronaldo, o “Fiote”? A este, a quem me refiro como “um menino bem criado”, eu agradeço pelo carinho, pela companhia no decorrer das disciplinas e no laboratório, pelos momentos no trabalho, pelas risadas e principalmente pelo apoio demonstrado! Não tenham dúvidas do meu carinho e da minha admiração!!

Os meus sinceros agradecimentos a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Katyane de Sousa Almeida, não só pela orientação, mas principalmente por sua generosidade, compreensão e paciência nos momentos em que precisei. Muito obrigada professora!!

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Baptista por ter aceito o convite para ser meu co-orientador, por contribuir com sua experiência e fornecer os conhecimentos

laboratoriais necessários na realização deste trabalho. Sua ajuda foi de extrema importância Professor. Muito obrigada!!

O meu muito obrigada ao Prof. Dr. Marlos Gonçalves, que não hesitou em colocar-se a disposição para ajudar, tanto em etapas necessárias ao processamento de amostras, como na realização da análise estatística. Professor, posso dizer que sua contribuição foi muito valiosa!!

Eu não poderia deixar de agradecer a minha amiga Mônica Calixto, pelas injeções de ânimo, pela amizade, pelos conselhos e pelas palavras de incentivo!! Minha amiga, você me ajudou muito! Obrigada!

Agradeço a doutoranda Glaucenyra Silva e a todos do Laboratório de Leptospirose e Brucelose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP) de Jaboticabal-SP, que contribuíram imensamente para o processamento das amostras envolvidas nesta pesquisa. Sem a sua ajuda talvez eu não tivesse conseguido finalizar este trabalho!! Muito obrigada!

À Rosiane e à Ana Clara eu agradeço pelos vários momentos de estudo e descontração com conversas paralelas (principalmente sobre nossos felinos, que amamos, não é Ana Clara?!). Meninas, a companhia de vocês me ensinou a manter a calma, por mais que a situação pareça difícil!!!

Agradeço a torcida da Prof.^a Dr.^a Bruna Alexandrino, que sempre falava, com entusiasmo, de como tudo iria dar certo! Obrigada Bruna, pelos “toques”, pela atenção e por sua prestatividade!!

No mais, gostaria de agradecer a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu pudesse concluir esta etapa da minha formação profissional, em especial a todos os animais, objetos de estudo, pelos quais adquiri grande respeito e carinho e sem os quais a concretização deste trabalho não seria possível. Muito obrigada!

“Pois os próprios montes podem ser removidos e os próprios morros podem ser abalados, mas a minha benevolência é que não será removida de ti, nem tampouco será abalado o meu pacto de paz”, disse Jeová, Aquele que tem misericórdia de ti.’

Isaías 54:10.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA.....	18
1 CONCEITO	18
2 HISTÓRICO	18
3 ETIOLOGIA.....	19
4 EPIDEMIOLOGIA.....	20
4.1 Distribuição.....	20
4.2 Cadeia epidemiológica.....	21
4.2.1 Fonte de infecção	21
4.2.2 Via de eliminação	22
4.2.3 Meio de transmissão	22
4.2.4 Porta de entrada.....	22
5 PATOGENIA	23
6 SINAIS CLÍNICOS.....	24

7 DIAGNÓSTICO	25
7.1 Métodos diretos.....	25
7.2 Métodos indiretos	27
8 TRATAMENTO E PROFILAXIA	29
REFERÊNCIAS.....	31

CAPÍTULO 2

Soropositividade para <i>Leptospira</i> spp. em ovinos do município de Colinas, estado do Tocantins, Brasil.....	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	41
2.2 ANIMAIS.....	41
2.3 COLETA DAS AMOSTRAS.....	42
2.4 TESTES SOROLÓGICOS.....	42
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
3 RESULTADOS.....	45
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÕES	56
AGRADECIMENTOS.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

RESUMO

Determinação da soropositividade para leptospirose em ovinos

A leptospirose é uma doença de ampla distribuição geográfica que afeta frequentemente a produtividade de pequenos ruminantes. Esta infecção é causada por bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira* spp. e caracteriza-se por ser uma importante causa de problemas reprodutivos e morte em animais de produção. Neste contexto, a espécie ovina pode ser acometida com frequência, visto que compõe a classe dos animais susceptíveis dentro de um sistema de criação. Considerando a importância da cadeia produtiva da ovinocultura e a ausência de dados soropidemiológicos sobre a leptospirose ovina no estado do Tocantins, a presente pesquisa teve por objetivo determinar a soropositividade para leptospirose em rebanhos de ovinos de 11 propriedades cadastradas na associação de ovinocultores do município de Colinas, Tocantins, Brasil. Os resultados para as 431 amostras de soro coletadas foram obtidos por meio do teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM), sendo cada amostra testada para uma bateria de 24 sorovares. A análise estatística descritiva foi utilizada para o cálculo da frequência total e da frequência para cada sorovar e para a comparação dos resultados frente às categorias animais como fator de risco ou proteção foi calculado o teste exato de Fisher, com $P < 0,05$, e a *Odds Ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Cada uma das propriedades pesquisadas apresentou pelo menos um animal positivo. Foi observada positividade para 16 sorovares, dos quais *Autumnalis*, *Hardjo bovis*, *Wolffi*, *Patoc* e *Hebdomadis* foram os mais frequentes. Portanto, como medidas de profilaxia e visando a manutenção da saúde do rebanho, recomenda-se o uso de vacinas polivalentes para os sorovares mais frequentes acompanhado de medidas básicas de manejo sanitário e isolamento e tratamento dos animais doentes.

Palavras-chave: *Leptospira*; pequenos ruminantes; sorologia

ABSTRACT

Determination of seropositivity for leptospirosis in sheep

Leptospirosis is a disease widely distributed that often affects the productivity of small ruminants. This infection is caused by bacteria belonging to the genus *Leptospira* spp. and characterized to be a major cause of reproductive failure and death in animal production. In this context, sheep can be often affected, seen that comprise the class of susceptible animals in a breeding system. Considering the importance of the productive chain of the sheep and the absence of seroepidemiological data on ovine leptospirosis in Tocantins state, the present study aimed to determine the seropositivity for leptospirosis in sheep flocks of 11 farms registered in association of sheep breeders of the city of Colinas, Tocantins, Brazil. The results for 431 serum samples collected were obtained by the Microscopic Agglutination Test (MAT) and each sample tested for a battery of 24 serovars. Descriptive statistical analysis was used to calculate the total frequency and to frequency for each serovar and to compare the results versus the animal categories as a risk factor or protective factor Fisher's exact test, with $P < 0.05$, and *Odds Ratio* with a confidence interval of 95 % were calculated. Each of the farms surveyed had at least one positive animal. Positivity was observed for 16 serovars, of which *Autumnalis*, *Hardjo bovis*, *Wolffi*, *Patoc* and *Hebdomadis* were the most frequent. So as prophylaxis and for the maintenance of herd health, we recommend the use of polyvalent vaccines for the most frequent serovars accompanied by basic measures of health management and isolation and treatment of sick animals.

Keywords: *Leptospira*; small ruminants; serology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura helicoidal da *Leptospira interrogans*, sorovar *copenhageni*..... 20
- Figura 2.** Reação de soroaglutinação microscópica (SAM): A- Amostra negativa para *Leptospira* spp.; B- Amostra positiva para *Leptospira* spp., onde os pontos brancos indicam as aglutinações em pelo menos 50 % do campo..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sorovares de <i>Leptospira</i> spp. utilizados na Reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) distribuídos de acordo com suas respectivas espécies e sorogrupos.....	43
Tabela 2.	Frequência de amostras negativas e positivas (valores relativos e absolutos), seguida dos principais sorovares e distribuída por propriedade na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), em ovinos de Colinas, Tocantins, 2011.....	45
Tabela 3.	Número de amostras positivas para diferentes sorovares de <i>Leptospira</i> spp. distribuídas por título e seguidas da frequência para cada sorovar frente a 431 ovinos de Colinas, Tocantins, 2011.....	46
Tabela 4.	Frequência de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo o sexo na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.....	47
Tabela 5.	Frequência de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo a idade na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.....	47
Tabela 6.	Distribuição das frequências de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo o sorovar em comparação ao sexo na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.....	48
Tabela 7.	Distribuição das frequências de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo o sorovar em comparação a idade na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.....	49
Tabela 8.	Número de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo critérios epidemiológicos obtidos de 8 propriedades para a pesquisa de <i>Leptospira</i> spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.....	50
Tabela 9.	Registros da presença de aglutininas anti- <i>Leptospira</i> spp.	

detectadas por meio da reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em ovinos no Brasil (2002 - 2012).....	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcento
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMJH	Meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Epiinfo	Programa Integrado para uso em Epidemiologia
EUA	Estados Unidos da América
G	Giro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Km ²	Quilômetro quadrado
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Metro
mL	Mililitro
N	Número de animais
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogênico
SAM	Soroaglutinação Microscópica
UNESP	Universidade Estadual Paulista
WHO	Organização Mundial de Saúde

INTRODUÇÃO

A ovinocultura é considerada uma atividade promissora do ramo agropecuário e contribui amplamente para o incremento da renda familiar do produtor rural (EMERENCIANO NETO et al., 2011). Dentro desta realidade, o rebanho ovino brasileiro encontra-se em constante crescimento, o que pode ser evidenciado por levantamentos feitos pelo IBGE nos anos de 2009, 2010 e 2011 que mostram números crescentes na ordem de 16.812.105, 17.380.581 e 17.662.201 respectivamente (IBGE, 2009; IBGE, 2010; IBGE, 2011).

A criação de ovinos também é uma atividade importante para a região norte, uma vez que, assim como o restante do Brasil, tem aumentado sua produção. Em 2011 o rebanho regional foi de 627.563 cabeças (IBGE, 2011), mais que as 586.237 cabeças produzidas no ano de 2010 (IBGE, 2010). O estado do Tocantins ocupa uma posição relevante frente a produção de ovinos, em 2010 o estado produziu 108.062 cabeças (IBGE, 2010), sendo que nos anos de 2011 e 2012 a produção foi de 113.544 e 122.388 cabeças, respectivamente (IBGE, 2011; IBGE, 2012). Dados como estes podem atestar a importância da atividade para a economia regional.

Apesar do aumento da criação de ovinos, fatores atrelados a nutrição, sanidade e reprodução podem influenciar na queda da produção, visto que estão diretamente ligados as fases de desenvolvimento dos animais. No que diz respeito a sanidade, pode-se destacar problemas como intoxicações e toxinfecções, doenças metabólicas e nutricionais, neoplasias, e principalmente as doenças infecciosas e parasitárias (RISSI et al., 2010).

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa de origem bacteriana, causada por diferentes sorovares do gênero *Leptospira* (DOMINGUES; LANGONI, 2001) que afeta a produtividade de pequenos ruminantes (MARTINS et al., 2012).

Os animais susceptíveis podem se infectar pelo contato direto, com secreções do trato reprodutivo, urina de animais infectados e através do contato sexual, ou de forma indireta, por meio de aerossóis ou água contaminados com a bactéria (FAINE et al., 1999). O diagnóstico dessa enfermidade pode ser realizado pelos sinais clínicos e detecção da bactéria em tecidos, sedimento urinário, ou pela presença de anticorpos no soro sanguíneo (FAINE et al., 1999).

Alguns estudos mostram que a prevalência da leptospirose nos ovinos varia entre 13,7% e 47,4% (LILENBAUM et al., 2008; MARTINS et al., 2012), sendo que os principais sorovares envolvidos são *Hardjo*, *Patoc*, *Autumnalis*, *Pyrogenes*, *Icterohaemorrhagiae* e *Senot* (MARTINS et al., 2012; AGUIAR et al., 2010; HASHIMOTO et al., 2010; HERRMANN et al., 2004).

Nesses animais, a enfermidade pode provocar a morte de cordeiros, inanição, infecção grave (RADOSTITS et al., 2002), febre, insuficiência hepática e/ou renal (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010), falhas reprodutivas e abortamentos geralmente no terço final da gestação (NASCIMENTO; SANTOS, 2008).

Assim, perdas econômicas com a doença são uma realidade, uma vez que estão relacionadas não só a morte e reposição de animais, mas também a gastos com assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais (ANGELO; CICOTI; BELTRAN, 2009).

Tendo em vista a influência desta enfermidade na queda da produção de ovinos, é de fundamental importância determinar sua prevalência, bem como os tipos de sorovares presentes na região tocantinense, a fim de controlar e evitar perdas futuras por meio do desenvolvimento de vacinas homólogas que atuem de forma específica contra as sorovarietades regionais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 CONCEITO

A leptospirose é uma doença septicêmica febril aguda de importância zoonótica causada por espiroquetas da espécie *Leptospira interrogans* que tem uma ampla gama de hospedeiros, incluindo os da vida selvagem. É uma doença complexa que pode infectar qualquer espécie hospedeira suscetível (SHIVARAJ et al., 2009).

2 HISTÓRICO

No livro “Leptospira and leptospirosis”, Faine et al. (1999) abordam alguns aspectos sobre o histórico da leptospirose. Nesse contexto, os autores relatam que a doença foi descrita pela primeira vez por Hipócrates como “icterícia infecciosa”, provavelmente entre 400 e 300 anos antes de Cristo. No ano de 1800, Larry, um médico francês, observou a ocorrência da icterícia infecciosa em soldados da tropa de Napoleão durante uma batalha na cidade do Cairo, no Egito. Mais tarde, no ano de 1803 William Wittman caracterizou a enfermidade como de início súbito com dores de cabeça, prostração, icterícia, derrame conjuntival, hemorragias petequiais e recaídas, relacionou-a com a presença de ratos e, a diferenciou de doenças como, malária, sífilis e disenteria. Em 1886, Adolf Weil publicou o trabalho onde observou a doença como causadora de icterícia, nefrite e esplenomegalia e, a partir de então, a enfermidade ficou conhecida como “Doença de Weil”.

Em 1915, no Japão, Inada et al. (1916) isolaram o possível microrganismo causador da doença após inocular sangue de mineradores infectados em um porquinho da índia. Esse microrganismo foi chamado de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* e, em 1917 propôs-se a criação do gênero *Leptospira*, pelo fato da bactéria possuir forma espiralada (FAINE et al., 1999).

No Brasil, os primeiros registros de leptospirose humana foram publicados no Estado do Rio de Janeiro em 1917 (BRASIL, 1999). Entretanto, Alexander (1960) observou que em 1911 o pesquisador McDowell já tinha diagnosticado a doença durante um pequeno surto no estado do Pará e que a partir deste reconhecimento

clínico, mais um diagnóstico foi estabelecido na região amazônica por Da Mata, no ano de 1919.

Com relação a leptospirose em ovinos no Brasil, o primeiro relato ocorreu em 1963, no estado de São Paulo, quando Santa Rosa e Pestana de Castro (1963), ao estudarem 400 animais, obtiveram uma frequência de 43% de soropositividade para a bactéria. Nessa ocasião, os sorovares mais comuns foram *Canicola*, *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* e *Sejroe*.

3 ETIOLOGIA

As leptospirosas são espiroquetas de aproximadamente 0,1 µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento e pertencem à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, gênero *Leptospira* (FAINE et al., 1999).

As bactérias causadoras da infecção pertencem às espécies *Leptospira biflexa* e *Leptospira interrogans*. Entretanto, somente *L. interrogans* é considerada patogênica, uma vez que a *Leptospira biflexa* caracteriza-se por ser de vida livre, considerada saprófita. Nesse sentido, atualmente a *L. interrogans* foi reclassificada em 13 espécies: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*, as quais são distribuídas em mais de 260 sorovarietades, agrupadas em 23 sorogrupos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

O corpo celular da leptospira tem a forma de um cilindro helicoidal (Figura 1), que consiste de material nuclear, citoplasma, membrana citoplasmática e uma porção de peptidoglicano da parede celular. Um flagelo periplásmico é rodeado pelo cilindro e situa-se no espaço periplasmático. A porção final de cada flagelo é inserido perto de um pólo de cilindro protoplásmico firmemente ligado a estruturas denominadas discos de inserção. O ponto distal de cada flagelo se estende para o centro da célula e pode ser sobreposto por flagelos originários no polo oposto (LEVETT, 2001).

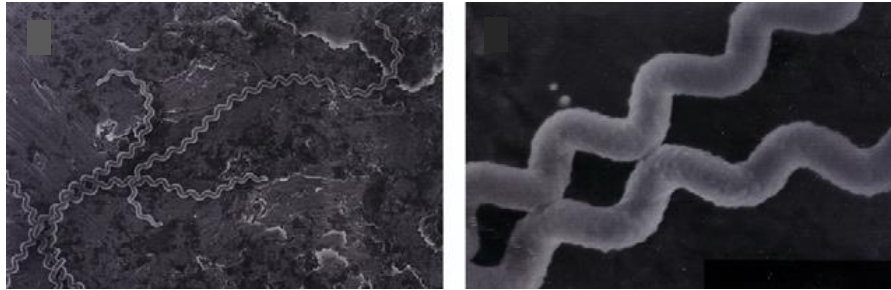


Figura 1 Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura helicoidal da *Leptospira interrogans*, sorovar *copenhageni*. Bharti et al., (2003): Crédito de imagem de Vsevolod Popov e Violet Han, do Departamento de Patologia da Universidade de Medicina do Texas, Galveston, TX, EUA.

A membrana citoplasmática e o peptídeoglicano da parede celular destas espiroquetas são cobertos por uma membrana exterior contendo lipopolissacarídeos (LPS), principal constituinte antigênico das leptospiros, estruturalmente e imunologicamente semelhantes aos LPS de bactérias gram negativas (FAINE et al., 1999).

As leptospiros são bactérias aeróbias obrigatórias, sensíveis a dessecação, ao frio, água salgada e a variações de pH. Tornam-se inativas em pH abaixo de seis ou maior que oito, temperaturas menores que 7°C ou maiores que 36°C, calor úmido (121°C) por 15 minutos e pasteurização. A inativação por agentes químicos ocorre por meio da utilização de solução de hipoclorito de sódio 1%, álcool etílico 70%, glutaraldeído, formaldeído, detergentes e ácidos (OIE, 2006).

4 EPIDEMIOLOGIA

4.1 Distribuição

A leptospirose é considerada uma zoonose de distribuição cosmopolita, porém, sua ocorrência é maior em países de clima tropical e subtropical, principalmente nos períodos chuvosos, visto que essas condições ambientais elevam a sobrevivência da bactéria, o que aumenta o risco de exposição e infecção de animais susceptíveis e seres humanos (OLIVEIRA et al., 2010).

Embora tenha distribuição mundial, surtos desta zoonose já foram notificados em países como Brasil (1983, 1988 e 1996), Nicarágua (1995), Rússia (1997), Estados Unidos (1998), Índia (1999) e Tailândia (2000) (WHO, 2005).

Em diversos Estados brasileiros há predominância de diferentes sorovares de *Leptospira spp.* encontrados em várias espécies de animais: suínos - *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagiae* em Minas Gerais, *Pomona* no Rio Grande do Sul, *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae* em Pernambuco e Rio de Janeiro, *Autumnalis* no Ceará e *Icterohaemorrhagiae* em Goiás, Paraná, Santa Catarina e São Paulo; equinos - *Icterohaemorrhagiae* no Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, *Grippotyphosa* no Mato Grosso, *Pyrogenes* na Paraíba e *Patoc* no Rio Grande do Sul; caninos - *Copenhageni* e *Icterohaemorrhagiae* em São Paulo e *Pyrogenes* no Piauí; bubalinos - *Hardjo* e *Pomona* em São Paulo; caprinos - *Icterohaemorrhagiae* e *Grippotyphosa* no Ceará, *Icterohaemorrhagiae* na Paraíba e *Pyrogenes* em São Paulo (FAVERO et al., 2002); e bovinos - *Hadjo* em São Paulo (GIRIO et al., 2005), *Hadjo*, *Grippotyphosa* e *Shermani* no Paraná (HASHIMOTO et al., 2012; HASHIMOTO et al., 2010) e *Butembo* em Santa Catarina (SALDANHA et al., 2007).

A soropositividade para leptospirose em ovinos foi constatada em várias regiões do Brasil, sendo observada em estados como Rondônia, Piauí, São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (AGUIAR et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; FAVERO et al., 2002; HERRMANN et al., 2004; MARTINS et al., 2012). Os principais sorovares observados nos referidos estudos foram *Patoc*, *Autumnalis* e *Pyrogenes*; *Autumnalis*, *Castellonis* e *Grippotyphosa*; *Icterohaemorrhagiae*, *Butembo* e *Castellonis*; *Hardjo* e *Senot*; e *Hardjo* respectivamente.

4.2 Cadeia Epidemiológica

4.2.1 Fonte de infecção

Animais silvestres, sinantrópicos e domésticos podem ser considerados hospedeiros primários da *Leptospira spp.* (OLIVEIRA; GUIMARÃES; MEDEIROS, 2009).

Como exemplo de animais silvestres que podem atuar como hospedeiros pode-se citar primatas, como o macaco-prego (*Cebus libinosus*) e o macaco-prego-

peito-amarelo (*Cebus xanthosternus*), e carnívoros, como o guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e a raposa (*Cerdocyon thous*) (PIMENTEL et al., 2009).

Com relação aos animais domésticos, os caninos (BROD et al., 2005), equinos (COIRO; LANGONI; SILVA, 2012), suínos (OSAVA et al., 2010), bovinos (MARQUES et al., 2010), ovinos (MELO et al., 2010) e caprinos (MARTINS et al., 2012) infectados atuam como fonte de infecção.

Tratando-se de roedores domésticos (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*) que abrigam a bactéria, o *Rattus norvegicus* é um clássico carreador, principalmente do sorovar mais patogênico para humanos, o sorovar *Icterohaemorrhagiae* (SHIMABUKURO et al., 2003).

4.2.2 Via de eliminação

A difusão da leptospirose para o meio ocorre pela presença de animais doentes ou portadores, que eliminam a bactéria pela urina, descargas cérvico-vaginais, fetos abortados, placenta (FAINE et al., 1999), e sêmen (HAMOND et al., 2013; LILENBAUM et al., 2008).

4.2.3 Meio de transmissão

Leptospira spp. pode permanecer no ambiente por longos períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento (HASHIMOTO et al., 2012), e pode ser transmitida por meio de água ou solo contaminados com material biológico de animais infectados (DOMINGUES; LANGONI, 2001; MUSSO; LA SCOLA, 2013), por meio do contato sexual ou pela inseminação artificial (LEVETT, 2001).

4.2.4 Porta de entrada

A bactéria penetra ativamente através da pele, mucosas, escoriações ou cortes, quando há o contato com urina e tecidos de animais infectados, água e aerossóis contaminados (MUSSO; LA SCOLA, 2013).

5 PATOGENIA

Após a invasão de tecidos, as leptospiplas difundem-se rapidamente para a corrente sanguínea, multiplicam-se ativamente no interstício e nos humores orgânicos, como sangue, linfa e líquido cefalorraquidiano (LCR), e então se direcionam para os diversos órgãos ou sistemas para produzir diferentes manifestações clínicas (ZUNINO; ROLANDO, 2007).

As bactérias circulam na corrente sanguínea (fase leptospirêmica) por até sete dias e, quando o número de leptospiplas no sangue e nos tecidos alcança uma concentração crítica, as lesões, devido à ação da toxina leptospiral S ou componentes celulares tóxicos, e sinais clínicos começam a se manifestar. A lesão primária constitui danos ao endotélio dos pequenos vasos sanguíneos, o que conduz a uma isquemia localizada em órgãos, podendo resultar em necrose tubular renal e hepatocelular, danos pulmonares, meningite, miosite e placentite (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Carvalho et al. (2011) verificaram que ovinos infectados apresentam lesões renais túbulo-intersticiais, com ocorrência de nefrite intersticial, provavelmente associada a presença de leptospiplas no lume de túbulos renais e na forma de agregados aderidos às células epiteliais tubulares, contribuindo para a manutenção da infecção por meio da eliminação pela urina. Geralmente essa eliminação de leptospiplas, denominada fase de leptospirúria, ocorre cerca de 10 dias após o aparecimento dos sinais clínicos (GROOMS; BOLIN, 2005).

A presença do agente pode ser observada no endotélio de vasos intersticiais, no citoplasma de células epiteliais tubulares, na cápsula de Bowman e nos capilares glomerulares, sendo o espaço túbulo-intersticial o local preferencial de lesão renal, com maior evidência de comprometimento dos túbulos proximais (CARVALHO et al., 2011). Isso ocorre porque as leptospiplas aderem-se e liberam toxinas e produtos de sua lise que danificam as células epiteliais tubulares (FERREIRA ALVES et al., 1987).

O surgimento de petéquias pode se fazer presente na superfície do rim. Manchas brancas podem ser observadas na superfície cortical, representando infiltração de células inflamatórias, e podem ser encontradas em infecções

subagudas e crônicas, como evidência da atrofia glomerular e de aglomerados de proteína tubular (FAINE et al., 1999).

Hemorragias, icterícia e trombocitopenia ocorrem em casos graves. A liberação de citocinas, como fator de necrose tumoral, liberadas por monócitos, devido à atividade endotóxica das leptospiros, pode explicar a lesão de células endoteliais e a hemorragia observada nos casos de leptospirose grave. Geralmente, há também leve granulocitose e esplenomegalia (HIGGINS, 1981).

Uma vez que os anticorpos circulantes aparecem, as leptospiros são removidas da circulação e tecidos por fagocitose. Danos nos tecidos, embora graves, podem ser reversíveis e seguidos de reparo completo (como no fígado e nos rins). Já os danos de longa duração, como em casos de miocardite, podem produzir fibrose caracterizada pelo aparecimento de pontos brancos na superfície dos órgãos afetados (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Formas subagudas e crônicas da doença estão frequentemente associadas com sequelas reprodutivas, incluindo infecção fetal em vacas prenhes, que abortam fetos autolisados. Ocorre também nascimento prematuro e o surgimento de bezerras infectados, os quais podem nascer aparentemente saudáveis (BOLIN, 1989).

Vários sorovares de *Leptospira* spp. podem causar abortamentos, geralmente no terço final da gestação, com morte do feto de 24 a 48 horas antes de ser expelido. Nesses casos o agente pode ser encontrado na placenta ou em cortes histológicos do fígado e dos rins do feto corados pela prata (NASCIMENTO; SANTOS, 2008).

Pode ocorrer vacuolização das superfícies das células endometriais no útero das ovelhas. Geralmente os fetos abortados apresentam sangramento, icterícia, ou ambos, e podem estar altamente infectados (FAINE et al., 1999).

6 SINAIS CLÍNICOS

Todos os animais domésticos são susceptíveis à infecção. Os infectados, por sua vez, podem ou não apresentar sinais clínicos e estão aptos a eliminar a bactéria no meio ambiente (DOMINGUES; LANGONI, 2001). Os sinais clínicos estão

frequentemente relacionados a doenças renais e hepáticas ou à deficiência reprodutiva, levando a um considerável impacto econômico devido à ocorrência de abortamentos, natimortos, infertilidade e diminuição da produção de leite nos rebanhos (OIE, 2006).

Na espécie bovina os sinais vêm como abortamento e infertilidade, mas pode ocorrer febre, anorexia, depressão, hemoglobinúria e paralisia do rúmen (DOMINGUES; LANGONI, 2001). Os abortamentos podem ocorrer por infecções pelos sorovares *Pomona* ou *Grippotyphosa*, entretanto, são típicos de infecções pelo sorovar *Hardjo* (GROOMS; BOLIN, 2005).

Nos ovinos, a leptospirose pode provocar morte de cordeiros em virtude de infecções congênitas, inanição, devido à agalactose aguda provocada pela infecção pelo sorovar *Hardjo* nas fêmeas, e infecção grave causada pelo sorovar *Grippotyphosa* (RADOSTITS et al., 2002). Uma baixa taxa de retorno ao cio foi associada à infecção pela *Leptospira Butembo* (SALDANHA et al., 2007).

7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leptospirose depende da história clínica, da vacinação ou não dos animais, e dos resultados de testes diagnósticos. Provas laboratoriais podem ser feitas diretamente, por meio da detecção da bactéria em tecidos e fluidos corporais, ou indiretamente, pela presença de concentrações de anticorpos em amostras de soro (GROOMS; BOLIN, 2005).

7.1 Métodos diretos

A reação de imunofluorescência, o isolamento e cultura, o exame histopatológico e a reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser utilizados para o diagnóstico direto da leptospirose (GROOMS; BOLIN, 2005).

A imunofluorescência é capaz de identificar leptospirosas em tecidos (fígado fetal, rins, fígado ou placenta) e no sedimento urinário e caracteriza-se por ser um teste rápido, ter razoável sensibilidade e poder ser realizada em amostras congeladas. Entretanto, o conjugado de anticorpo fluorescente disponível para uso

geral não é sorotipo-específico, portanto, o exame sorológico ainda é necessário para ajudar a indicar o sorovar infectante (GROOMS; BOLIN, 2005).

O isolamento e cultivo de *Leptospira* spp. depende do material biológico de escolha e do tempo de evolução da doença. Durante a fase leptospirêmica, do primeiro ao décimo dia após o início dos sinais clínicos, o material mais adequado é o sangue, entretanto, líquido cefalorraquidiano, urina e material post-mortem também podem ser utilizados (WHO, 2008).

A cultura de leptospiros extraídas de urina ou tecido é difícil e demorada, no entanto, o isolamento da leptospira no organismo do animal permite a identificação definitiva do sorovar infectante (GROOMS; BOLIN, 2005).

As leptospiros crescem a uma temperatura ótima de 28-30°C em meios enriquecidos com vitaminas B1 e B12, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônio. Algumas estirpes requerem a adição de piruvato ou soro de coelho para o isolamento inicial. O crescimento de contaminantes de espécimes clínicos pode ser inibido pela adição de 5-fluorouracil, gentamicina, ácido nalidíxico ou rifamicina (FAINE et al., 1999).

As amostras para cultura devem ser coletadas antes da administração de antibióticos. Diversas variações do meio de cultura de Fletcher foram descritas, todavia, o meio mais utilizado é baseado no ácido oleico-albumina: o meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Becton Dickinson and Company, Difco) (MUSSO; LA SCOLA, 2013).

O crescimento das leptospiros é muitas vezes retardado no isolamento primário e as culturas têm de ser mantidas por cerca de treze semanas antes de serem descartadas. Porém, o cultivo em meios semissólidos (com 0,1 a 0,2% de ágar) permite que o crescimento atinja uma densidade máxima. Esse crescimento pode ser visualizado logo após a superfície do meio, numa zona relacionada à tensão ótima de oxigênio, conhecida como anel ou disco de Dinger (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

No que diz respeito a histopatologia, a utilização de corantes pode ser eficaz para identificação de leptospiros em tecidos animais. Esta técnica é a única que

pode ser usada em tecidos fixados em formalina (rim de adultos e placenta, pulmão, fígado e rim no caso de abortos). A aplicação da coloração pela prata ou imunohistoquímica para cortes de tecidos permite a detecção de antígeno leptospiral nos túbulos renais e interstício do fígado, rim, pulmão ou placenta. Porém, a baixa sensibilidade é uma desvantagem desta técnica de diagnóstico. Além disso, as leptospirosas estão presentes em pequeno número nos tecidos afetados, particularmente durante a leptospirose crônica, e o sorovar infectante não pode ser determinado pelo exame histopatológico. Assim, estudos sorológicos também devem ser conduzidos (GROOMS; BOLIN, 2005).

Em se tratando de PCR, a análise de urina é considerada mais confiável do que a análise de tecidos. A maioria dos testes de PCR é capaz de detectar a presença de leptospirosas, mas não é capaz de determinar o sorovar infectante. Apesar da PCR ser uma técnica sensível e específica para o diagnóstico de leptospirose, o processo é complexo e extremamente sensível à contaminação com DNA leptospiral exógeno, sendo portanto, propenso a reações falso-positivas (GROOMS; BOLIN, 2005).

Entretanto, é válido ressaltar que a PCR convencional vem sendo substituída pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que combina amplificação e detecção do produto amplificado na mesma reação e tem uma excelente sensibilidade e especificidade e menor risco de contaminação (ESPY et al., 2006). Um ensaio multiplex para a simultânea detecção e diferenciação de leptospirosas patogênicas e não patogênicas também pode ser utilizado (BEDIR et al., 2010).

7.2 Métodos indiretos

A Soroaglutinação Microscópica (SAM) é a técnica mais utilizada para o diagnóstico da leptospirose, uma vez que apresenta sensibilidade e especificidade altas e permite a identificação dos sorovares presentes na amostra (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Essa técnica envolve a mistura de diluições adequadas de soro com a cultura diluída de leptospirosas vivas de diferentes sorovares. A presença de anticorpos é indicada pela aglutinação das leptospirosas (GROOMS; BOLIN, 2005).

Apesar da sensibilidade e especificidade altas, a SAM não diferencia os anticorpos resultantes da infecção dos anticorpos provenientes da vacinação (altos títulos podem persistir por seis meses ou mais), podendo causar problemas com relação à triagem da doença. Além disso, esse teste exige a utilização de culturas vivas de sorovares de leptospiros prevalentes na área geográfica específica (FAINE et al., 1999).

A interpretação dos resultados sorológicos para o diagnóstico da leptospira também é influenciada pela reatividade cruzada entre anticorpos para diferentes sorovares e pela falta de consenso sobre quais títulos são indicativos de infecção ativa (GROOMS; BOLIN, 2005).

Tendo em vista possíveis reações cruzadas, um animal infectado com um único sorovar pode ter anticorpos contra mais de um durante o teste de aglutinação. No entanto, considera-se como causador da infecção o sorovar que apresenta o maior título. Torna-se então importante considerar que no início do curso de uma infecção aguda, pode ocorrer uma resposta acentuada de aglutinação para um sorovar diferente do sorovar infectante (GROOMS; BOLIN, 2005).

O critério para considerar um resultado indicativo de infecção por leptospira, é geralmente o surgimento de um título elevado na SAM (a partir de 1:400) na presença de sinais clínicos e uma história clínica compatível (FAINE et al., 1999). Porém a detecção de títulos muito elevados de anticorpos pode ser suficiente para estabelecer o diagnóstico. Isto pode ser demonstrado na investigação de abortamentos causados pelos sorovares *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Canicola*, e *Icterohaemorrhagiae*, em que o título de anticorpos é frequentemente 1:600. Já os títulos de anticorpos para o sorovar *Hardjo* podem ser muito baixos ou negativos no momento do aborto. Nesses casos, ou diante da ocorrência de natimortos, pode ser útil fazer o teste sorológico em soro fetal a partir de diluições 1:10, em contraste com os estudos em adultos, onde a diluição inicial habitual é de 1:100 (GROOMS; BOLIN, 2005).

O Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) detecta anticorpos que reagem com um antígeno gênero-específico e não é adequada para a identificação do sorovar causador ou sorogrupo. Esse teste é geralmente positivo a partir do sexto

ao oitavo dia após a infecção, e permite a detecção de anticorpos específicos da classe IgM, podendo permanecer detectável por vários meses ou mesmo anos (MUSSO; LA SCOLA, 2013).

Entretanto, a maioria dos kits comerciais de ELISA utiliza sorovares não patogênicos, como *Leptospira biflexa Patoc* (MUSSO; LA SCOLA, 2013). Além disso, a sensibilidade e especificidade deste teste não correspondem às aquelas observadas na SAM, e a sua utilização como único teste de diagnóstico não é recomendada (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

8 TRATAMENTO E PROFILAXIA

A estreptomicina foi um dos primeiros antibióticos a serem utilizados para a terapia da leptospirose e é considerada, até hoje, uma das melhores opções de tratamento. Essa substância pode ser caracterizada por eliminar a leptospirose a partir do 3º dia após o início do tratamento (GIRIO et al., 2005). Nesse contexto, Saldanha et al. (2007) observaram a eficácia do sulfato de estreptomicina no controle de leptospirose em bovinos, onde 92% dos animais tratados voltaram à vida reprodutiva normal.

Para outros autores, a associação dihidroestreptomicina e penicilina G constitui o melhor tratamento, embora antibióticos como a oxitetraciclina, o tilmicosin e o ceftiofur também apresentem bons resultados (ALT; ZUERNER; BOLIN, 2001).

O controle da leptospirose pode ser realizado pela identificação das fontes de infecção, medidas de higiene das instalações e equipamentos, controle de roedores, quarentena dos animais adquiridos, imunização sistemática do rebanho (FAINE et al., 1999) e isolamento e tratamento dos animais afetados (LUCHEIS; FERREIRA, 2011). Além disso, a educação, a informação e a comunicação compõem os pilares fundamentais para minimizar os danos causados pela doença (OLIVEIRA; GUIMARÃES; MEDEIROS, 2009).

Em adição às medidas sanitárias e ao tratamento dos animais infectados, a vacinação constitui a principal ação para profilaxia, uma vez que aumenta a imunidade dos animais e, pode reduzir o número de doentes renais e o risco de infecção para os manipuladores, especialmente quando acompanhada de

programas educativos em higiene e saúde pública (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; MELO et al., 2010).

O uso de vacinas induz principalmente a produção de IgG, com seu pico duas semanas subsequente a dose de reforço, sendo esta administrada quatro semanas após a primeira (RADOSTITS et al., 2002).

A identificação da variante sorológica da leptospira é importante, visto que a imunidade adquirida é sorovariedade específica, ou seja, a imunização protege somente contra as sorovariedades homólogas ou semelhantes antigenicamente, não havendo imunidade cruzada (LEVETT, 2001). Assim, a permanência de um sistema de vigilância epidemiológica para monitorar a distribuição espacial dos sorovares de *Leptospira* spp. é de grande importância (FAVERO et al., 2002).

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; VASCONCELLOS, S. A.; SOUZA, G. O.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos do Município de Monte Negro, Estado de Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 529-532, 2010.
- ALEXANDER, A.D. The distribution of leptospirosis in Latin America. **Bull World Health Organ**, v. 23, n. 1, p. 113-25, 1960.
- ALT, D. P.; ZUERNER, R. L.; BOLIN, C. A. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 5, p.636-639, 2001.
- ANGELO, G.; CICOTI, C. A. R.; BELTRAN, M. P. Doenças infecciosas que acometem a reprodução das fêmeas - revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VII, n. 12, 2009. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ET9MiXcEZxhF1Jh_2013-6-21-10-56-8.pdf>. Acesso em: 11 maio 2012.
- BEDIR, O.; KILIC, A.; ATABEK, E.; KUSKUCU, A.M.; TURHAN, V.; BASUSTAOGLU, A.C. Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay. **Polish Journal Microbiology**, v. 59, p. 167-173, 2010.
- BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-71, 2003.
- BOLIN, C. A.; THIERMANN, A. B.; HANDSAKER, A. L.; FOLEY, J. W. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* type *Hardjo-bovis* infection of pregnant cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 161-165, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia e Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos: **Manual de leptospirose**, 2nd ed., Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1999, 98p.
- BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 294-300, 2005.

CARVALHO, S.M.; GONÇALVES, L.M.F.; MACEDO, N.A.; GOTO, H.; SILVA, S.M.M.S.; MINEIRO, A.L.B.B.; KANASHIRO, E.H.Y.; COSTA, F.A.L. Infecção por leptospiros em ovinos e caracterização da resposta inflamatória renal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 637-642, 2011.

COIRO, C. J.; LANGONI, H.; SILVA, R.C. Epidemiological Aspects in the *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* Infection in Horses from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 620-623, 2012.

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Manejo Sanitário de Bovinos. in: _____. **Manejo sanitário animal**. Rio de Janeiro: EPUD, 2001. cap. 20, p.161-186.

EMERENCIANO NETO, J. V.; PEREIRA, G. F.; MEDEIROS, H. R.; GRACINDO, A. P. A. C.; DIFANTE, G. S. Caracterização e avaliação econômica de sistemas de produção de agricultura familiar no semiárido. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.1, n.1, p.22-29, 2011.

ESPY, M.J.; UHL, J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER, E.A.; YAO, J.D.C.; WENGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL, F.R. III; SMITH, T.F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiol Reviews**, v.19, p. 165- 256, 2006.

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

FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA-NETO, J. S. Sorovares de Leptospiros 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.

FERREIRA ALVES V. A.; VIANNA M. R.; YASUDA P. H.; BRITO T. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **Journal of Pathology**, v.151, p.125-131, 1987.

GIRIO, T. M. S.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S.; MIASHYRO, S.; RODRIGUES, L. H.; SCARCELLI, E. P.; TOMA, S. B. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospirose em touros (*Bostaurus indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar *Hardjo*. **Arquivos do Instituto de Biológico**, v.72, n.2, p.161-170, 2005.

GROOMS, D. L.; BOLIN, C. A. Diagnosis of Fetal Loss Caused by Bovine Viral Diarrhea Virus and *Leptospira* spp. **Veterinary Clinics: Food and animal practice**, v. 21, p. 463-472, 2005.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; MEDEIROS, M.A.; LILENBAUM, W. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 1157-1159, 2013.

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A. D.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE, M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalência e fatores de risco associados

à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012.

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

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

HIGGINS, R. A minireview of the pathogenesis of acute leptospirosis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 22, n.1, p. 277-278, 1981.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, 2012. Disponível em:<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/ppm2012.pdf>. Acesso em: 10 jan 2014.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, 2011. Disponível em:<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2011_v39_br.pdf>. Acesso em: 10 jan 2014.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, 2010. Disponível em:<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2010_v38_br.pdf>. Acesso em: 10 jan 2014.

IBGE. **Censo Agropecuário**, 2009. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab04.pdf>. Acesso em: 08 maio 2012.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis Icterohaemorrhagica). **The Journal of "Experimental Medicine"**, v. 23, p. 377-402, 1916.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p.296-326, 2001.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F.Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELLOS, S.A. Detection of *Leptospira* spp in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.837-842, 2008.

LUCHEIS, S.B.; FERREIRA JÚNIOR, R.S. Ovine leptospirosis in Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 394-405, 2011.

MARQUES, A.E.; ROCHA, W. V.; BRITO, W. M. E. D.; FIORAVANTI, M. C. S.; PARREIRA, I. M.; JAYME, V. S. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e

aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 607-617, 2010.

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, C. K.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 44, p. 773-777, 2012.

MELO, L. S. S.; CASTRO, M. B.; LEITE, R. C.; MOREIRA, E. C.; MELO, C. B. Principais aspectos da infecção por *Leptospira* sp em ovinos. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1235-1241, 2010.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, p. 245-252, 2013.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologias do Útero Gestante. In: _____. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 6, p. 70-83.

OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). **Leptospirosis**, 2006. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/disease-information-summaries/>> . Acesso em: 20 Abr. 2009.

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; 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.

OLIVEIRA, D. S. C.; GUIMARÃES, M. J. B.; MEDEIROS, Z. Modelo produtivo para Leptospirose. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n.1, p.17-26, 2009.

OSAVA, C. F.; SALABERRY, S. R. S.; NASCIMENTO, C. C. N.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C.; MOREIRA, R. Q.; CASTRO, J. R.; RIGO, V. H. B. Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em diferentes sistemas de criação de suínos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 202-207, 2010.

PIMENTEL, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; MARVULO, M. F. V.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; SILVA, J. C. R.; EVÊNCIO NETO, J. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 1009-1014, 2009.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças bacterianas. In: _____. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.20, p. 850-915.

RISSI, D. R.; PIEREZAN, F.; OLIVEIRA FILHO, J. C.; FIGHERA, R.; IRIGOYEN, L. F.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Doenças de ovinos da região Central do

Rio Grande do Sul: 361 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 21-28, 2010.

SALDANHA, G. B.; CAVAZINI, N. C.; SILVA, A. S.; FERNANDES, M. B.; BADKE, M. R. T.; PIVETTA, C. G. Sorologia positiva para *Leptospira butembo* em bovinos apresentando problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1182-1184, 2007.

SANTA ROSA, C.A.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Presença de aglutininas anti-*Leptospira* em soro de ovinos e caprinos no Estado de São Paulo. **Arquivos Instituto de Biologia**, v. 30, p. 93-98, 1963.

SHIMABUKURO, F. H.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H.; SILVA, A. V.; PINHEIRO, J. P.; PADOVANI, C. R. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospirosas pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.40, n.1, p.243-253, 2003.

SHIVARAJ; VENKATESHA, M.D.; RAJKUMARI SANJUKTA; SRIPAD, K.; SANJEEVKUMAR; CHANDRANAIAK, B.M.; RENUKAPRASAD, C. Leptospirosis in sheep and its diagnosis, **Veterinary World**, v.2, n. 7, p. 263-264, 2009.

ZUNINO, E. M.; ROLANDO, P. P. Leptospirosis: puesta al día. **Revista Chilena de Infectología**, v.24, n.3, p. 220-226, 2007.

WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION). **Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control**. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS, 2008, p.124.

WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION). Weekly epidemiological record/ Relevé épidémiologique hebdomadaire, **World Health Organization**, Switzerland, v. 80, n. 3, p. 21-28, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

**Soropositividade para *Leptospira* spp. em ovinos do município de Colinas,
estado do Tocantins, Brasil**

SEBASTIANA ADRIANA PEREIRA SOUSA

ARAGUAÍNA/TO

2014

RESUMO

Soropositividade para *Leptospira* spp. em ovinos do município de Colinas, estado do Tocantins, Brasil

Devido a importância da leptospirose como causa de problemas reprodutivos e baixa produtividade dos animais de produção, foram coletadas 431 amostras de sangue de ovinos provenientes de 11 propriedades do município de Colinas do Tocantins, com o objetivo de determinar a presença de aglutininas anti-*Leptospira* spp. por meio da reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), realizada a partir da diluição 1:100. As amostras foram coletadas de forma asséptica por punção da veia jugular externa e submetidas a centrifugação a 700G por 10 minutos para separação da fração sérica. Cada amostra de soro foi testada para uma bateria de 24 sorovares. Foi realizada análise estatística descritiva para o cálculo da frequência total e da frequência de cada sorovar. O teste exato de Fisher, com $P < 0,05$ como estatisticamente significativo, bem como a razão de chance (*Odds ratio*), com intervalo de confiança de 95% foram obtidos para a comparação dos resultados frente às categorias animais como fator de risco ou proteção. Cada uma das 11 propriedades pesquisadas apresentou pelo menos um animal positivo. A frequência foi de 32,48% de positividade para 16 sorovares, dos quais *Autumnalis* (12,53%), *Hardjo bovis* (10,67%), *Wolffi* (9,74%), *Patoc* (6,03%) e *Hebdomadis* (4,64%) foram os mais frequentes. Animais adultos mostraram-se como sendo fatores de risco para a doença. Portanto, como medidas de profilaxia e visando a manutenção da saúde do rebanho, recomenda-se o uso de vacinas polivalentes pelo menos para *Autumnalis*, *Hardjo bovis*, *Wolffi*, *Patoc* e *Hebdomadis* acompanhado de medidas básicas de manejo sanitário, como limpeza de instalações e pasto, evitar o contato dos ovinos com outros animais domésticos, realizar verificação sorológica periódica dos animais utilizados para reprodução e recém adquiridos e, isolamento e tratamento dos animais infectados.

Palavras-chave: leptospirose; pequenos ruminantes; soroaglutinação

ABSTRACT

Seropositivity for *Leptospira* spp. in sheep of the Colinas city, State of Tocantins, Brazil

Due to the importance of leptospirosis as a cause of reproductive problems and low productivity of livestock, blood samples from 431 sheep from 11 farms in Colinas were collected in order to determine the presence of agglutinins anti - *Leptospira* spp. by Microscopic Agglutination Test (MAT) conducted by diluting 1:100. Samples were collected aseptically by puncture of the jugular vein and subjected to centrifugation at 700G for 10 minutes to separate the serum fraction. Each serum sample was tested for a battery of 24 serovars. Descriptive statistical analysis was performed to calculate the total frequency and the frequency of each serovar. The Fisher's exact test , with $P < 0.05$ as statistically significant, and the *Odds Ratio*, with a confidence interval of 95 %, were obtained for the comparison of results versus the animal categories as a risk factor or protection. Each of the 11 farms surveyed had at least one positive animal. The frequency was 32.48% positivity for 16 serovars, of which *Autumnalis* (12.53%), *Hardjo bovis* (10.67%), *Wolffi* (9.74 %), *Patoc* (6.03 %) and *Hebdomadis* (4.64 %) were the most frequent. Adult animals showed up as being risk factors for the disease. So as prophylaxis and for the maintenance of herd health, we recommend the use of polyvalent vaccines for at least to *Autumnalis*, *Hardjo bovis*, *Wolffi*, *Patoc* and *Hebdomadis* accompanied by basic measures of health management, such as cleaning of facilities and pasture, avoid sheep contact with others livestock animals, serologic periodic verification of animals used for breeding and newly acquired and, isolation and treatment of infected animals.

Keywords : leptospirosis; small ruminants; agglutination

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição cosmopolita que ocorre frequentemente em países de clima tropical e subtropical (OLIVEIRA et al., 2010). Essa enfermidade é causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que se caracterizam por serem espiroquetas aeróbicas obrigatórias de grande motilidade (HAAKE, 2000), medindo de 0,1 µm X 6-20 µm (FAINE et al., 1999).

A espécie de leptospira responsável pela infecção nos animais domésticos e no homem é *L. interrogans*, que foi reclassificada em 13 espécies: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*, distribuídas em mais de 260 sorovariedades, agrupadas em 23 sorogrupos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Os hospedeiros de manutenção são, frequentemente, espécies silvestres e, algumas vezes, animais domésticos e de produção. Roedores domésticos como *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus* também abrigam a bactéria. Desses, o *Rattus norvegicus* é um clássico carreador, principalmente do sorovar mais patogênico para humanos, o sorovar *Icterohaemorrhagiae* (SHIMABUKURO et al., 2003).

O contato com os hospedeiros de manutenção ou com áreas contaminadas com urina, tecidos ou secreções do trato reprodutor pode causar a infecção por *Leptospira* spp. em outras espécies (HASHIMOTO et al., 2010; MUSSO; LA SCOLA, 2013). A bactéria adentra o organismo ativamente, principalmente pela pele. No entanto, mucosas como nasal, oftálmica, ou oral, também podem atuar como porta de entrada (FAINE et al., 1999).

Sorovariedades como *Hardjo*, *Grippotyphosa* e *Wolffi* costumam afetar a produtividade de bovinos (ARAÚJO et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2012), suínos (OSAVA et al., 2010), caprinos e ovinos (MARTINS et al., 2012).

Os sinais clínicos da doença estão frequentemente relacionados a manifestações renais e hepáticas ou a deficiência reprodutiva, com alta mortalidade,

abortamentos, natimortos, infertilidade e diminuição da produção de leite nos rebanhos (BHARTI et al., 2003).

Assim como nos bovinos, os ovinos podem apresentar febre, anorexia, icterícia intensa, hemoglobinúria, anemia e sinais neurológicos, sendo que nos casos agudos os animais sofrem septicemia, dispneia, intolerância ao exercício, fraqueza e morte (PUGH, 2004).

O diagnóstico clínico desta enfermidade é dificultoso porque há grande variedade de sinais clínicos, sendo indicados os exames laboratoriais (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Nesse sentido, podem ser utilizados exames diretos, como a imunofluorescência, que identifica leptospiros em tecidos e no sedimento urinário, o exame histopatológico, a cultura e isolamento (GROOMS; BOLIN, 2005), a reação em cadeia da polimerase (PCR) simples, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (ESPY et al., 2006) e a multiplex PCR (BEDIR et al., 2010).

Em se tratando de exames indiretos, a Soroaglutinação Microscópica (SAM) é o exame mais utilizado, uma vez que apresenta sensibilidade e especificidade altas e permite a identificação dos sorovares presentes na amostra (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Devido a importância da leptospirose na diminuição da produtividade dos animais de produção e a falta de estudos com a espécie ovina na região tocantinense, o presente trabalho objetivou determinar a frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em ovinos oriundos de 11 propriedades localizadas na área rural do município de Colinas do Tocantins, estado do Tocantins, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Colinas do Tocantins, o qual abrange uma área de 843,84 Km², localizado a latitude 08°03'33" sul, longitude 48°28'30" oeste e 277m de altitude. O clima é tropical úmido com temperatura média de 26°C, com variação de 18°C e 30°C, caracterizado por período chuvoso, entre os meses de dezembro e fevereiro, e período de estiagem ao longo do ano (TOCANTINS, 2011).

Esse município pertencente à microrregião de Araguaína, Estado do Tocantins e possui uma associação de ovinocultores, com todas as propriedades criadoras cadastradas.

O trabalho se deu por meio de visitas a 11 propriedades de Colinas, Tocantins, entre março de 2010 a maio de 2011. Durante esse período foi realizada a coleta de amostras de sangue e a aplicação de questionários, com o intuito de estudar a presença da leptospirose no rebanho ovino da região. Dentre as informações contidas nos questionários, o tipo de criação, presença de vacinação, tipo de alimentação e presença de manejo sanitário foram objeto de pesquisa.

2.2 ANIMAIS

O N amostral foi calculado utilizando o programa Epi Info 6.04 (Programa Integrado para uso em Epidemiologia), considerando a possibilidade de detecção da doença em 50% dos animais (correspondente a doenças de ocorrência desconhecida em determinada população), com intervalo de confiança 95% e um erro estatístico de 5%, resultando em um N de 369 animais. Foi acrescido um valor de 10% desse número para reduzir potenciais perdas.

Assim, o rebanho experimental constituiu-se de 431 ovinos mestiços distribuídos em três categorias: animais jovens (91), fêmeas (268) e machos (72, sendo 70 desses reprodutores). Dentro de cada categoria, foram examinados 20% do total de animais de cada propriedade e 100% dos machos reprodutores.

Em todas as propriedades os animais eram submetidos a um sistema de criação extensivo, o pasto era a base de *Brachiaria* sp., o suplemento fornecido era sal mineral e a água para consumo era de açudes e outras fontes naturais. Os animais contactantes eram bovinos e animais silvestres.

No que diz respeito a saúde dos rebanhos, todos os proprietários referiram abortos esporádicos, entretanto, a presença de sinais como fraqueza, icterícia e morte de animais não foi constatada.

2.3 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas de maneira asséptica, pela punção da veia jugular externa, obtendo-se aproximadamente 10 mL de sangue. Após a coleta o material foi depositado em tubos de ensaio sem anticoagulante, armazenado em caixa de isopor com gelo e enviado ao Laboratório de Higiene e Saúde Pública da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, para a separação dos soros por centrifugação a 700G por 10 minutos. Os soros foram alíquotados em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, em duplicata, devidamente identificados e armazenados a -20 C° para realização dos exames sorológicos e posterior análise dos resultados.

2.4 TESTES SOROLÓGICOS

Para o diagnóstico sorológico foi empregada a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) segundo Cole; Sulzer; Pursell (1973) utilizando 24 sorovares vivos de *Leptospira* spp. (Tabela 1). Verificou-se a presença de anticorpos anti-*Leptospira* a partir de uma diluição 1:100, sendo uma parte do soro sanguíneo para quatro partes de solução tamponada de Sørensen. Alíquotas de 100µL desta diluição foram depositadas em placas de polietileno com 96 poços e, em seguida adicionada uma mesma quantidade de cada antígeno vivo cultivado em EMJH líquido (Difco, EUA), sem contaminação ou auto-aglutinação e diluído em solução tamponada de Sørensen na proporção de 1:2.

Tabela 1. Sorovares de *Leptospira* spp. utilizados na Reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) distribuídos de acordo com suas respectivas espécies e sorogrupos

ESPÉCIE	SOROGRUPO	SOROVAR
<i>L. biflexa</i>	<i>Andamana</i>	<i>Andamana</i>
	<i>Semarang</i>	<i>Patoc</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Ballum</i>	<i>Castellonis</i>
	<i>Celledoni</i>	<i>Whiticombi</i>
	<i>Javanica</i>	<i>Javanica</i>
	<i>Serjoe</i>	<i>Hardjo bovis</i>
	<i>Tarassovi</i>	<i>Tarassovi</i>
<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	<i>Australis</i>
	<i>Autumnalis</i>	<i>Autumnalis</i>
	<i>Bataviae</i>	<i>Bataviae</i>
	<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>
	<i>Djasiman</i>	<i>Senot</i>
	<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Copenhageni</i>
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>
	<i>Pyrogenes</i>	<i>Pyrogenes</i>
	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>
	<i>Serjoe</i>	<i>Wolfi</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Butembo</i>
	<i>Cynoptery</i>	<i>Cynoptery</i>
	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Grippotyphosa</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>Panama</i>	<i>Panama</i>
<i>L. santarosai</i>	<i>Shermani</i>	<i>Shermani</i>
<i>L. weilii</i>	<i>Australis</i>	<i>Bratislava</i>

As placas foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas e, posteriormente a leitura foi realizada depositando-se uma gota da mistura soro-antígeno em lâmina de microscopia e examinando sob objetiva de 40x, com ocular de 15x, em um microscópio óptico com condensador de campo escuro (Oleman®). Foram consideradas positivas as amostras que, na diluição 1:100, apresentaram no mínimo 50% de aglutinação no campo examinado (Figura 2).

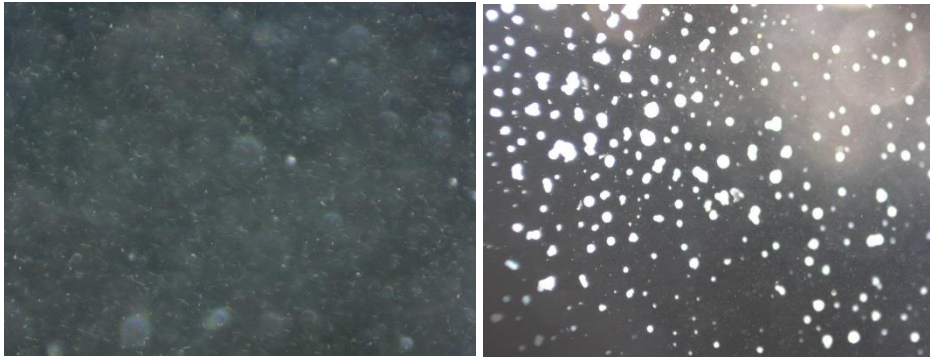


Figura 2. Reação de soroaglutinação microscópica (SAM): A- Amostra negativa para *Leptospira* spp.; B- Amostra positiva para *Leptospira* sp., onde os pontos brancos indicam as aglutinações em pelo menos 50 % do campo. Crédito de imagens: Msc. Glaucenyra Silva, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UNESP Jaboticabal, SP.

Uma propriedade foi considerada positiva quando apresentou pelo menos um animal sororreagente (título ≥ 100). As amostras reagentes na diluição 1:100 foram submetidas a titulação em diluições seriadas na razão 2 até 1:800. O sorovar com maior titulação em uma amostra foi considerado como o provável causador da infecção.

Após serem testadas na Universidade Federal do Tocantins as amostras foram enviadas ao Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose e Brucelose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, onde a soroaglutinação foi repetida.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo da frequência total e da frequência de cada sorovar foi feito dividindo-se o número de animais sorologicamente positivos pelo número de animais amostrados, utilizando-se análise estatística descritiva por meio de distribuição absoluta e relativa.

Para avaliação dos resultados frente às categorias (animais jovens, fêmeas e machos) e dados epidemiológicos foram criadas tabelas de contingência 2x2, separando os animais positivos e negativos segundo os critérios analisados. As matrizes foram então analisadas pelo teste exato de Fisher, considerando-se $P \leq 0,05$

como estatisticamente significativo. Na sequência, foi calculada a razão de chance (*Odds ratio*), com seu respectivo intervalo de confiança de 95% para verificação dos critérios estudados como fatores de risco ou proteção (THRUSFIELO, 2004).

Todos os testes foram realizados empregando-se o programa Graphpad® Prism, versão 5.0 (San Diego, Estados Unidos).

3 RESULTADOS

Cada uma das 11 propriedades pesquisadas apresentou pelo menos um animal positivo na SAM, sendo que das 431 amostras coletadas, 140 (32,48%) apresentaram títulos ≥ 100 para no mínimo um sorovar (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de amostras negativas e positivas (valores relativos e absolutos), seguida dos principais sorovares e distribuída por propriedade na pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), em ovinos de Colinas, Tocantins, 2011.

PROPRIIDADE	NEGATIVOS	POSITIVOS	PRINCIPAIS SOROVARES
A	19/25 (76)	6/25 (24)	<i>Autumnalis, Butembo</i>
B	30/41 (73,17)	11/41 (26,83)	<i>Hardjo, Shermani, Wolffi</i>
C	65/96 (67,71)	31/96 (32,29)	<i>Autumnalis, Hardjo, Wolffi</i>
D	19/26 (73,08)	7/26 (26,92)	<i>Autumnalis</i>
E	13/15 (86,67)	2/15 (13,33)	<i>Autumnalis</i>
F	17/19 (89,48)	2/19 (10,52)	<i>Autumnalis</i>
G	11/19 (57,90)	8/19 (42,10)	<i>Autumnalis, Panama, Shermani</i>
H	30/37 (81,09)	7/37 (18,91)	<i>Autumnalis</i>
I	11/24 (45,84)	13/24 (54,16)	<i>Autumnalis, Hardjo, Wolffi</i>
J	19/37 (51,44)	18/37 (48,56)	<i>Hardjo, Wolffi, Hebdomadis</i>
L	57/92 (61,96)	35/92 (38,04)	<i>Wolffi, Hardjo, Autumnalis</i>
TOTAL	291/431 (67,52)	140/431 (32,48)	

As amostras examinadas foram positivas para 16 dos 24 sorovares testados e uma amostra foi positiva para até seis sorovares diferentes. Os sorovares mais frequentes foram: *Autumnalis* (12,53%), *Hardjo bovis* (10,67%), *Wolffi* (9,74%), *Patoc* (6,03%) e *Hebdomadis* (4,64%) (Tabela 3). É importante observar que dentre os

sorovares de maior frequência, *Autumnalis* foi o de principal ocorrência em 8 das 11 propriedades estudadas (Tabela 2). Com relação aos títulos obtidos, os maiores foram para *Wolffi*, *Hebdomadis*, *Hardjo bovis*, *Grippotyphosa* (Tabela 3).

Tabela 3. Número de amostras positivas para diferentes sorovares de *Leptospira* spp. distribuídas por título e seguidas da frequência para cada sorovar frente a 431 ovinos de Colinas, Tocantins, 2011.

SOROVAR	TÍTULO				TOTAL
	100	200	400	800	
<i>Australis</i>	4	2	1	1	8/ 431 (1,85)
<i>Autumnalis</i>	43	10	1	0	54/ 431 (12,53)
<i>Bratislava</i>	9	1	0	1	11/ 431 (2,55)
<i>Butembo</i>	10	1	0	0	11/ 431 (2,55)
<i>Compenhageni</i>	2	1	0	0	3/ 431 (0,7)
<i>Grippotyphosa</i>	1	1	2	3	7/ 431 (1,62)
<i>Hardjo bovis</i>	22	15	4	5	46/ 431 (10,67)
<i>Hebdomadis</i>	12	2	0	6	20/ 431 (4,64)
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	0	0	0	1/ 431 (0,23)
<i>Panama</i>	3	0	0	0	3/ 431 (0,7)
<i>Patoc</i>	23	2	0	1	26/ 431 (6,03)
<i>Pomona</i>	7	0	0	0	7/ 431 (1,62)
<i>Pyrogenes</i>	1	0	0	0	1/ 431 (0,23)
<i>Shermani</i>	5	5	2	0	12/ 431 (2,78)
<i>Tarassovi</i>	5	0	1	0	6/ 431 (1,39)
<i>Wolffi</i>	25	9	2	6	42/ 431 (9,74)

Dos 72 machos e das 268 fêmeas que participaram da pesquisa, 34 (47,22%) e 97 (36,19%), respectivamente, demonstraram-se sororreagentes. Não houve associação entre o fator sexo e a positividade ($P > 0,05$) (Tabela 4), assim, o fato do animal ser macho ou fêmea não mostrou ter influência sobre resultados positivos ou negativos.

Tabela 4. Frequência de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo o sexo na pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.

CATEGORIA	REAGENTES	NÃO REAGENTES	P	OR (IC 95%)
Machos	34/72 (47,22)	38/72 (52,78)	0,1019	1,577 (0,9325 - 2,668)
Fêmeas	97/268 (36,19)	171/268 (63,81)		
TOTAL	131/340 (38,52)	209/340 (61,48)		

P<0,05 significativo pelo teste exato de Fisher

OR=Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança

No que diz respeito a idade da população estudada, nos 340 animais adultos (soma de machos e fêmeas) investigados a positividade foi de 38,53%, ao passo que 9,9% dos 91 animais jovens foram reagentes. Houve uma forte associação entre a idade do animal e a positividade (P<0,05), onde o fato de ser adulto atua como fator de risco para a ocorrência da doença (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo a idade na pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.

IDADE	REAGENTES	NÃO REAGENTES	P	OR (IC 95%)
Adultos	131/340 (38,52)	209/340 (61,48)	<0,0001	5,711 (2,77 - 11,76)
Jovens	9/91 (9,89)	82/91 (90,11)		
TOTAL	140/431 (32,48)	291/431 (67,52)		

P<0,05 significativo pelo teste exato de Fisher

OR=Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança

Os sorovares de maior frequência para as fêmeas foram *Autumnalis* (18,65%), *Hardjo bovis* (10,07%) e *Wolffi* (8,95%) e, para os machos foram *Hardjo bovis* (22,22%), *Wolffi* (20,83%), *Hebdomadis* (15,27) e *Patoc* (15,27).

Ao avaliar a existência de associação entre o sexo e o risco de infecção para diferentes sorovares, notou-se que para os sorovares *Autumnalis*, *Hardjo bovis*,

Hebdomadis, *Patoc*, *Shermani*, *Tarassovi* e *Wolffi* houve associação ($P < 0,05$). Nesse sentido, o sexo masculino atuou como um fator de proteção para a infecção pelo sorovar *Autumnalis*, enquanto que para *Hardjo bovis*, *Hebdomadis*, *Patoc*, *Shermani*, *Tarassovi* e *Wolffi* o fato do animal ser macho revelou ser um fator de risco (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição das frequências de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo o sorovar em comparação ao sexo na pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.

SOROVAR	REAGENTES	NÃO REAGENTES	P	OR (IC 95%)
<i>Autumnalis</i>				
Machos	3/72 (4,16)	69/72 (95,84)	0,0016	0,1896 0,05730 – 0,6271
Fêmeas	50/268 (18,65)	218/268 (81,35)		
<i>Hardjo</i>				
Machos	16/72 (22,22)	56/72 (77,78)	0,0091	2,550 1,288 – 5,051
Fêmeas	27/268 (10,07)	241/268 (89,93)		
<i>Hebdomadis</i>				
Machos	11/72 (15,27)	61/72 (84,73)	0,0006	5,189 2,059 – 13,08
Fêmeas	9/268 (3,36)	259/268 (96,64)		
<i>Patoc</i>				
Machos	11/72 (15,27)	61/72 (84,73)	0,0085	3,272 1,415 – 7,562
Fêmeas	14/ 268 (5,23)	254/268 (94,77)		
<i>Shermani</i>				
Machos	5/72 (7,95)	67/72 (93,05)	0,0388	3,925 1,104 - 13,96
Fêmeas	5/268 (1,86)	263/268 (98,14)		
<i>Tarassovi</i>				
Machos	4/72 (5,56)	68/72 (94,44)	0,0198	7,824 1,403 – 43,63
Fêmeas	2/268 (0,75)	266/268 (99,25)		
<i>Wolffi</i>				
Machos	15/72 (20,83)	57/72 (79,17)	0,0108	2,675 1,320 a 5,424
Fêmeas	24/ 268 (8,95)	244/268 (91,05)		

$P < 0,05$ significativo pelo teste exato de Fisher
OR=Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança

Os animais jovens foram positivos apenas para *Australis*, *Autumnalis*, *Hardjo bovis*, *Patoc*, *Shermani* e *Wolffi*, onde os principais sorovares foram *Hardjo bovis* e *Wolffi*, com uma frequência de 3,3% cada.

Quando da avaliação para existência ou não de associação entre a idade do animal e a positividade para os sorovares encontrados, o sorovar *Patoc* revelou associação significativa ($P=0,0242$), no entanto a idade não representou fator de risco ou proteção para a infecção. Os sorovares *Autumnalis*, *Hardjo bovis* e *Wolffi* mostraram-se associados ao critério idade, onde o fato dos animais serem adultos atua como fator de risco, favorecendo a infecção (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição das frequências de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo o sorovar em comparação à idade na pesquisa de anticorpos anti- *Leptospira* spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.

SOROVAR	REAGENTES	NÃO REAGENTES	P	OR (IC 95%)
<i>Autumnalis</i>				
Adultos	53/340 (15,59)	287/340 (84,41)	<0,0001	16,62 2,265 – 121,9
Jovens	1/91 (1,1)	90/91 (98,9)		
<i>Hardjo</i>				
Adultos	43/340 (12,65)	297/340 (87,35)	0,0073	4,247 1,286 – 14,02
Jovens	3/91 (3,3)	88/91 (96,7)		
<i>Patoc</i>				
Adultos	25/340 (7,35)	315/340 (92,65)	0,0242	7,143 0,9542 – 53,47
Jovens	1/91 (1,1)	90/91 (98,9)		
<i>Wolffi</i>				
Adultos	39/340 (11,47)	301/340 (88,53)	0,0167	3,801 1,147 - 12,60
Jovens	3/91 (3,3)	88/91 (96,7)		

$P < 0,05$ significativo pelo teste exato de Fisher

OR=Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança

Em oito das 11 propriedades estudadas foi possível a obtenção de informações a respeito de assistência técnica, vacinação (era realizada apenas vacinação para clostridiose), limpeza das instalações e estação (seca ou chuvosa) em que as amostras foram coletadas, fatores relevantes para o estudo da epidemiologia da doença. Juntas, essas propriedades (A, C, D, E, F, I, J e L) somaram 334 animais, sendo 220 negativos e 114 positivos.

Apesar da obtenção desses critérios, não houve associação entre os mesmos e a positividade dos animais ($P > 0,05$) (Tabela 8). Em outras palavras, os resultados

obtidos aqui mostram que a presença de assistência técnica, a coleta das amostras em período chuvoso, a manutenção da limpeza das instalações e a vacinação para clostridiose não foram considerados fatores de proteção ou risco para infecção.

Tabela 8. Número de ovinos reagentes e não reagentes (valores relativos e absolutos), segundo critérios epidemiológicos obtidos de 8 propriedades para a pesquisa de *Leptospira* spp. pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), no município de Colinas, Tocantins, 2011.

CRITÉRIO	REAGENTES	NÃO REAGENTES	P	OR (IC 95%)
Assistência				
Sim	31/96 (32,3)	65/96 (67,7)	0,7030	0,8906 0,5379 - 1,475
Não	83/238 (34,87)	155/238 (65,13)		
Estação chuvosa				
Sim	18/37 (48,65)	19/37 (51,35)	0,0648	1,984 0,9957 - 3,951
Não	96/297 (32,33)	201/297 (67,67)		
Limpeza				
Sim	66/188 (35,10)	122/188 (64,9)	0,7274	1,105 0,6992 - 1,745
Não	48/146 (32,87)	98/146 (67,13)		
Vacinação Clostridium				
Sim	89/271 (32,84)	182/271 (67,16)	0,3057	0,7433 0,4225 - 1,308
Não	25/63 (39,7)	38/63 (60,3)		

P<0,05 significativo pelo teste exato de Fisher
OR=Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança

4 DISCUSSÃO

A leptospirose está distribuída em várias regiões do Brasil. Estudos realizados em diversos estados brasileiros, seguidos da frequência e dos principais sorovares encontrados podem ser visualizados na tabela 9.

Tabela 9. Registros da presença de aglutininas anti-*Leptospira* spp. detectadas por meio da reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em ovinos no Brasil (2002 - 2012).

AUTOR	ESTADO	ANO	NÚMERO DE AMOSTRAS	FREQUÊNCIA (%)	SOROVARES MAIS FREQUÊNTES
FAVERO et al.	SP	2002	284	0,70	<i>Icterohaemorrhagiae</i> , <i>Butembo</i> , <i>Castellonis</i> e <i>Hebdomadis</i>
AZEVEDO et al.	RN	2004	115	3,5	<i>Autumnalis</i> , <i>Castellonis</i> e <i>Pomona</i>
HERRMANN et al.	RS	2004	1360	34,26	<i>Hardjo</i> , <i>Sentot</i> , <i>Hardjoprajitino</i> <i>Fortbragg</i> e <i>Wolffi</i>
SILVA et al.	RS	2007	44	20,5	<i>Icterohaemorrhagiae</i> , <i>Sejroe</i> , <i>Javanica</i> e <i>Bataviae</i>
LILENBAUM et al.	RJ	2008	292	13,7	<i>Hardjo</i> e <i>Shermani</i>
AGUIAR et al.	RO	2010	141	33,3	<i>Patoc</i> , <i>Autumnalis</i> e <i>Pyrogenes</i>
HIGINO et al.	PB	2010	80	7,5	<i>Autumnalis</i> , <i>Icterohaemorrhagiae</i>
HASHIMOTO et al.	PR	2010	70	38,57	<i>Icterohaemorrhagiae</i>
CARVALHO et al.	PI	2011	119	28,6	<i>Autumnalis</i> , <i>Castellonis</i> e <i>Grippothyphosa</i>
MARTINS et al.	RJ	2012	308	47,4	<i>Hardjo</i>
Presente estudo	TO	2011	431	32,48	<i>Autumnalis</i> , <i>Hardjo</i> <i>bovis</i> , <i>Wolffi</i> , <i>Patoc</i> e <i>Hebdomadis</i>

A frequência geral observada neste trabalho (32,48%) é similar as observadas por Aguiar et al. (2010) no município de Monte Negro, estado de Rondônia (33,3%) e por Carvalho et al. (2011) em propriedades rurais do Município de Teresina, estado do Piauí (28,6%). Outros autores ainda observaram frequências maiores em estados como Paraná (38,57%), Rio Grande do Sul (34,26%) e Rio de Janeiro (47,4%) (HASHIMOTO et al., 2010; HERRMANN et al., 2004; MARTINS et al., 2012), o que

possibilita visualizar a importância da doença em animais de produção, como os ovinos.

De forma homóloga aos resultados deste estudo, onde os sorovares de maior ocorrência foram *Autumnalis* (12,53%), *Hardjo bovis* (10,67%), *Wolffi* (9,74%), *Patoc* (6,03%) e *Hebdomadis* (4,64%), na pesquisa desenvolvida por Aguiar et al. (2010) os sorovares mais frequentes foram *Patoc* (29,7%), *Autumnalis* (14,8%), *Pyrogenes* (10,6%), *Australis* (4,2%), *Bratislava* (4,2%), *Hardjo* (4,2%), *Icterohaemorrhagiae* (4,2%), *Castellonis* (2,1%) e *Hebdomadis* (2,1%). Também a título de comparação, uma pesquisa com caprinos no estado do Rio de Janeiro, obteve *Hardjo* (72,1%) e *Wolffi* (21,6%), acompanhados de *Bratislava* (4,5%) e *Grippotyphosa* (1,8%), como os sorovares de maior destaque (LILENBAUM et al., 2007).

A maior ocorrência do sorovar *Autumnalis* também foi visualizada nos estados do Piauí (29,4%) e da Paraíba (6,25%) (CARVALHO et al., 2011; HIGINO et al., 2010). Faine et al. (1999) acreditam que *Autumnalis*, acompanhado de *Grippotyphosa* e *Pomona*, é um dos sorovares mais prevalentes em ovinos de todo o mundo, e que esses animais atuam como hospedeiros acidentais, uma vez que seus hospedeiros naturais são respectivamente o rato; o mão-pelada, o gambá e o esquilo; o suíno, o mão-pelada e o gambá (RADOSTITS et al., 2000).

No presente estudo o sorovar *Hardjo* foi o segundo mais frequente. De forma similar, durante inquéritos epidemiológicos para a detecção de leptospirose em ovinos nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro este sorovar também foi referido como o de maior frequência (HERRMANN et al., 2004; MARTINS et al., 2012).

O sorovar *Hardjo* demonstra alta frequência em bovinos, sugerindo-os como importante fonte de infecção (HASHIMOTO et al., 2012). Assim, embora os bovinos sejam os hospedeiros principais do sorovar *Hardjo*, o estreito convívio com ovinos, principalmente nos grandes rebanhos, propicia a transmissão entre espécies (HERRMANN et al., 2004). Isso pode ter ocorrido com os animais estudados, uma vez que os mesmos tinham contato com bovinos.

A prevalência de sorovares como *Butembo*, *Grippotyphosa* e *Shermani* também encontrados aqui, sugerem a participação de espécies silvestres na

transmissão da enfermidade (HASHIMOTO et al., 2012), visto que possivelmente a transmissão ocorra devido ao contato direto dos animais com ambientes contaminados com *Leptospira* spp. oriunda de roedores e animais silvestres, caracterizando a infecção como acidental (LILENBAUM, 1996).

Nesse contexto, Souza Júnior et al. (2006), durante um estudo com animais silvestres resgatados do lago da Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães, localizada entre os municípios de Lajeado e Ipueiras, no estado do Tocantins, observaram a frequência do sorovares *Pomona*, *Brasiliensis*, *Grippothyphosa*, *Autumnalis*, *Hebdomadis*, *Javanica* e *Icterohaemorrhagiae* em 46 (16,1%) das 286 amostras de soro obtidas de *Cebus apela* (macaco-prego), e *Brasiliensis* em duas (20%) de 10 amostras de *Cerdocyon thous* (raposa cinzenta).

O estudo citado a cima pode ser importante para ajudar a explicar a frequência de vários sorovares na presente pesquisa, tendo em vista que os animais estudados tinham contato, não só com bovinos e outros animais domésticos, mas também com animais silvestres.

O presente trabalho não detectou nenhuma associação do critério sexo frente à positividade dos ovinos estudados, o que corrobora com o fato de que não há predileção por sexo na infecção para leptospirose (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Por outro lado, houve forte associação entre a positividade e a idade dos animais, onde ser adulto foi considerado como fator de risco para a infecção. Isso provavelmente está associado a questões reprodutivas, uma vez que a maioria dos animais adultos em reprodução está exposta ao contato mútuo, facilitando a disseminação da doença.

No que diz respeito aos principais sorovares encontrados nas fêmeas, ao estudar os fatores envolvidos na infecção de fêmeas bovinas, outro trabalho também identificou os sorovares *Hardjo* e *Wolffi*, como sendo de frequência significativa (OLIVEIRA et al., 2010). Bem como as fêmeas, os machos na presente pesquisa foram positivos principalmente para *Hardjo* e *Wolffi*, fato que pode ser inerente ao tipo de criação a qual esses animais eram submetidos, sistema extensivo, onde o convívio de ambos os sexos e a presença de falhas no manejo sanitário são características comuns.

Ainda que não haja predileção da doença por sexo (CORRÊA; CORRÊA, 1992), ao comparar esse critério com os sorovares encontrados, fato de ser macho foi considerado fator de proteção para a infecção pelo sorovar *Autumnalis*, e fator de risco para *Hardjo bovis*, *Hebdomadis*, *Patoc*, *Shermani*, *Tarassovi* e *Wolffi*. Nesse sentido, durante o período de reprodução é provável que os machos cubram várias fêmeas e isso pode aumentar o risco de infecção dos mesmos, principalmente pelos sorovares *Wolffi* e *Hardjo*, que estão intimamente associados a problemas de cunho reprodutivo (MARQUES et al., 2010).

Raciocínio parecido aplica-se com relação a comparação entre a idade dos animais e a infecção por diferentes sorovares, onde adultos apresentaram-se como fator de risco para a infecção por *Autumnalis*, *Hardjo bovis* e *Wolffi*. Provavelmente isso se deu porque o fato de ser adulto e estar em reprodução pode ter contribuído para o contato com esses sorovares. Entretanto, vale ressaltar que até o momento não se constatou a existência de estudos que comprovem a relação entre sorovar e idade.

No tocante aos critérios epidemiológicos (como a existência de assistência técnica, vacinação, limpeza de instalações) analisados como possíveis fatores de risco ou proteção, não houve nenhuma associação dos mesmos com a presença da doença no rebanho estudado. Esses resultados discordam das medidas descritas para a prevenção da infecção, uma vez que a presença de assistência e um manejo sanitário adequado deveriam atuar como fatores de proteção. Desse ponto de vista, não é descartada a possibilidade de improbidade não intencional, por parte de alguns dos entrevistados durante a coleta das informações, visto que características pessoais ou questões socioeconômicas de cada indivíduo podem interferir na descrição da real situação.

Em termos de profilaxia, vacinas elaboradas com sorovares locais mais prevalentes provavelmente produzem resposta imunológica superior quando comparada às vacinas polivalentes normalmente produzidas para uso comercial. Além disso, é válido ressaltar que vacinas experimentais elaboradas com as amostras de sorovares autóctones também estão se mostrando eficientes no controle da leptospirose (CHIARELI et al., 2012).

Visto que a maioria das vacinas utilizadas no mercado atua basicamente contra os sorovares *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Hardjo bovis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* e *Wolffi* (ARDUINO et al., 2009) e considerando a relevante frequência do sorovar *Autumnalis*, principalmente nas fêmeas estudadas, sugere-se a inclusão de *Autumnalis*, *Hebdomadis* e *Patoc* a fim de promover melhor eficácia na prevenção da leptospirose ovina, uma vez que, de acordo com os resultados desta pesquisa, estes sorovares mostraram-se de importância para a infecção do rebanho.

Reforça-se então, a necessidade de estudos maiores para o desenvolvimento de vacinas com base em antígenos ainda não disponibilizados no mercado, os quais podem estar presentes nas criações.

Também vale a pena enfatizar que além da utilização das vacinas com antígenos regionais, a identificação, o isolamento e o tratamento dos animais infectados são de extrema importância para evitar a disseminação da infecção (LUCHEIS; FERREIRA, 2011), não só para o restante do rebanho, mas principalmente para os seres humanos suscetíveis.

5 CONCLUSÕES

Os sorovares *Australis*, *Autumnalis*, *Bratislava*, *Butembo*, *Compenhageni*, *Grippotyphosa*, *Hardjo bovis*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Panama*, *Patoc*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Shermani*, *Tarassovi*, e *Wolffi* estão presentes nos ovinos da região rural do município de Colinas, estado do Tocantins.

Como medida locais de profilaxia indica-se o uso de vacinas polivalentes pelo menos para *Autumnalis*, *Hardjo bovis*, *Wolffi*, *Patoc* e *Hebdomadis*, além de evitar o contato do rebanho ovino com outros animais domésticos e realizar verificação sorológica periódica para leptospirose nos animais utilizados para reprodução, principalmente os recém adquiridos.

É válido ressaltar que medidas como limpeza de instalações e pasto, correto descarte de materiais resultantes de abortamento, quarentena e testes sorológicos de animais vindos de outras propriedades e isolamento e tratamento dos animais infectados são de extrema importância para o controle da leptospirose, não só nos animais, mas também em humanos, visto que a doença caracteriza-se por ser uma zoonose.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. Ao professor Luís Antônio Mathias (Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose e Brucelose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - UNESP/Jaboticabal-SP), pela realização de exames laboratoriais.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n 3-4, p. 287-296, 2010.
- ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; MAGAJEVSKI, F.S.; PEREIRA, G.T. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 575-582, 2009.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; VASCONCELLOS, S. A.; SOUZA, G. O.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos do Município de Monte Negro, Estado de Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 529-532, 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 Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.4, p.430-435, 2005.
- AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; ANDRADE, J.S.L.; BATISTA, C.S.A.; CLEMENTINO, I.J.; SANTOS, F.A. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 11, n. 3, p. 167-170, 2004.
- BEDIR, O.; KILIC, A.; ATABEK, E.; KUSKUCU, A.M.; TURHAN, V.; BASUSTAOGLU, A.C. Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay. **Polish Journal Microbiology**, v. 59, p. 167-173, 2010.
- BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICARDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-71, 2003.
- CARVALHO, S.M.; GONÇALVES, L.M.F.; MACEDO, N.A.; GOTO, H.; SILVA, S.M.M.S.; MINEIRO, A.L.B.B.; KANASHIRO, E.H.Y.; COSTA, F.A.L. Infecção por leptospiras em ovinos e caracterização da resposta inflamatória renal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 637-642, 2011.
- CHIARELI, D.; COSATE, M.R.V.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.C.; LOBATO, F.C.F., DA SILVA, J.A.; TEIXEIRA, J.F.B.; MARCELINO, A.P. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 633-639, 2012.
- COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PURSELL, A.R. Improved microtechnique for the leptospiral agglutination test. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 976-980, 1973.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Leptospiroses. In:_____. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p. 219-232.

ESPY, M.J.; UHL, J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER, E.A.; YAO, J.D.C.; WENGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL, F.R. III; SMITH, T.F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiol Rerviews**, v.19, p. 165- 256, 2006.

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

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

GROOMS, D. L.; BOLIN, C. A. Diagnosis of Fetal Loss Caused by Bovine Viral Diarrhea Virus and *Leptospira* spp. **Veterinary Clinics: Food and animal practice**, v. 21, p. 463-472, 2005.

HAAKE, D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146, p. 1491–504, 2000.

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A. D.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE, M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012.

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

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

HIGINO, S.S.S.; AZEVEDO, S.S.; FIGUEIREDO, S.M.; SILVA, M.L.C.R.; BATISTA, C.S.A. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no município de Patos, Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 525-527, 2010.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F.Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELLOS, S.A. Detection of *Leptospira* spp in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.837-842, 2008.

LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N.; RISTOW, P.; MOREIRA, M.C.; FRÁGUAS, S.; CARDOSO, V.S.; OELEMANN, W.M.R. A Serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis–encephalitis vírus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 408-412, 2007.

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v.18, n.1, p.9-13, 1996.

LUCHEIS, S.B.; FERREIRA JÚNIOR, R.S. Ovine leptospirosis in Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 394-405, 2011.

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

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, C. K.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 44, p. 773-777, 2012.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, p. 245-252, 2013.

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; 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.

OSAVA, C. F.; SALABERRY, S. R. S.; NASCIMENTO, C. C. N.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C.; MOREIRA, R. Q.; CASTRO, J. R.; RIGO, V. H. B. Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em diferentes sistemas de criação de suínos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 202-207, 2010.

PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Rocca; 2004. 420 p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine – A textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses**. 9° ed. London: W.B. Saunders; 2000. 1880p.

SHIMABUKURO, F. H.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H.; SILVA, A. V.; PINHEIRO, J. P.; PADOVANI, C. R. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiroses pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.40, n.1, p.243-253, 2003.

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

SOUZA JÚNIOR, M.F.; LOBATO, Z.I.P.; LOBATO, F.C.F.; MOREIRA, É.C.; OLIVEIRA, R.R.; LEITE, G.G.; FREITAS, T.D.; ASSIS, R.A. Presença de anticorpos

da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 292-294, 2006.

THRUSFIELO, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2. Ed. São Paulo: Roca; 2004, p. 556.

TOCANTINS. Prefeitura de Colinas do Tocantins. **Clima**. Colinas, 2011. Disponível: <<http://colinas.to.gov.br/conteúdo/clima/18/>>. Acesso em: 09 maio 2012.