

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PREVALÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM REBANHOS
BOVINOS NO PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL**

Aline Fernanda Miashiro

CAMPO GRANDE, MS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

PREVALÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM REBANHOS
BOVINOS NO PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL

Prevalence of leptospirosis in cattle herds in the Pantanal of Mato Grosso do Sul

Aline Fernanda Miashiro

Orientadora: Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde
Animal.

CAMPO GRANDE, MS, 2013

Certificado de aprovação

ALINE FERNANDA MIASHIRO

**PREVALÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM REBANHOS BOVINOS NO
PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL**

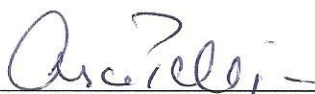
Prevalence of leptospirosis in cattle herds in the Pantanal of Mato Grosso do Sul

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado (a) em: 30/07/2013

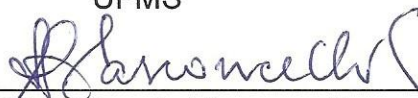
BANCA EXAMINADORA:



Doutora Aiesca Oliveira Pellegrin
Orientadora - EMBRAPA



Doutora Ana Luiza Alves Rosa Osório
UFMS



Doutor Silvio Arruda Vasconcellos
USP



AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela oportunidade.

À Dra. Aiesca, pela orientação e confiança.

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela atenção e cordialidade no atendimento aos alunos.

Aos colegas do Iagro, pela cessão das amostras para a realização do trabalho, sem as quais seria impossível sua realização.

Ao Prof Silvio Arruda Vasconcellos, a Zenaide Maria de Moraes e a Giselle Oliveira de Souza, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por abrirem as portas do laboratório para este projeto e tão gentilmente me apoiarem em toda a fase de análises.

À minha família, que me apoiou em todos os momentos de minha vida.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista dos seus objetivos, mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

RESUMO

MIASHIRO, A. F. **Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Foi realizado um estudo epidemiológico da leptospirose em fêmeas acima de 24 meses, provenientes de 246 rebanhos, e 2.766 animais amostrados aleatoriamente nos nove municípios que compõem a região do Pantanal de Mato Grosso do Sul, bem como identificados os fatores de risco associados à doença. As amostras de sangue foram coletadas no período de setembro a novembro de 2009 e examinadas pelo teste de aglutinação microscópica ante uma coleção de 24 antígenos vivos de *Leptospira spp*, representantes dos sorovares Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Batavie, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippytyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panamá, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Sentot, Andamana e Patoc. Adicionalmente, representantes de doze estirpes de leptospiros isoladas no Brasil foram adicionados à coleção de antígenos do teste de soroaglutinação microscópica (MAT). A prevalência aparente foi de 66% e a prevalência real de animais infectados, de 79,80%, com intervalo de confiança IC 95% (78,3- 81,3) e 241 rebanhos apresentando pelo menos um animal reagente. Os sorovares mais prováveis foram o Hardjo seguido pelo Wolffi. Os resultados demonstram que a leptospirose bovina continua presente no Pantanal, com alta prevalência, tanto de rebanhos quanto individual, sendo os principais fatores de risco para a doença o tipo de exploração e a raça.

Palavras-chave: Leptospirose. Bovinos. Epidemiologia. Pantanal.

ABSTRACT

MIASHIRO, A. F. **Prevalence of leptospirosis in cattle herds in the Pantanal of Mato Grosso do Sul**. 2013. 52f. Dissertation (Master's in Animal Health) – College of Veterinary Medicine and Zootechniques, Post-Graduate Program in Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul

This is an epidemiological study of leptospirosis in 24 month-old females from 246 herds. Two thousand, seven hundred and sixty six (2,766) animals were randomly sampled in the nine counties comprising the region of Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. The risk factors associated with the disease were also identified. Blood samples were collected from September to November 2009 and examined by microscopic agglutination test against a collection of 24 live antigens of *Leptospira spp*, representatives of serovars Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Batavie, Canicola Whitcombi, Cynopteri, Grippytyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Sentot, Andamana, and Patoc. Additionally, twelve representatives of *Leptospira* strains isolated in Brazil were added to the collection of antigens for the microscopic agglutination test (MAT). The apparent prevalence was 66% and the actual prevalence of infected animals was 79.80%, with a confidence interval of 95% (78.3 to 81.3) and 241 herds having at least one reactive animal. The most likely serovars were Hardjo followed by Wolffi. Results show that bovine leptospirosis is still present in Pantanal, with high prevalence, both as animals and herds, the main risk factors for the disease being the type of cattle farming and race.

Keywords: Leptospirosis. Cattle herds. Epidemiology. Pantanal.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
Elisa	Enzyme-linked Immunoassay
Esp	Especificidade do teste
EspR	Especificidade de rebanho
Iagro-MS	Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio (razão de chances)
Pa	Prevalência aparente
PaR	Prevalência aparente de rebanho
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de hidrogênio iônico
Pr	Prevalência real
PrR	Prevalência real de rebanho
SAM	Soroaglutinação microscópica
Sen	Sensibilidade do teste
SenR	Sensibilidade de rebanho
USP	Universidade de São Paulo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Histórico	12
2.2 Etiologia	13
2.3 Patogenia	14
2.4 Sinais clínicos.....	15
2.5 Diagnóstico.....	16
2.6 Epidemiologia	18
2.6.1 Leptospirose bovina no Brasil.....	20
2.7 Controle.....	22
3 REFERÊNCIAS.....	24
4 ARTIGO.....	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAIS E MÉTODOS	33
Amostragem	33
Análise de dados.....	35
QUESTIONÁRIO	35
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	43
ANEXO 1	50

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose emergente, de distribuição cosmopolita, causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que podem apresentar mais de 200 diferentes sorovares (FAINE et al., 1999), sendo motivo de preocupação, tanto na área de saúde pública quanto veterinária (OIE, 2008).

A literatura tem demonstrado a evidência sorológica da leptospirose em rebanhos bovinos no Brasil (LANGONI et al., 2000; HOMEM et al., 2000; FAVERO et al., 2001; THOMPSON et al., 2006; LAGE et al., 2007) e no Estado de Mato Grosso do Sul (MADRUGA et al., 1980; PELLEGRIN et al., 1999; FAVERO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2009). Embora os diferentes estudos epidemiológicos apontem para a presença de diferentes sorovares infectando bovinos, o mais frequente tem sido o sorovar Hardjo, tanto no âmbito nacional (VASCONCELLOS et al., 1997; FAVERO et al., 2001; LILENBAUM; SOUZA, 2003; ARAÚJO et al., 2005; THOMPSON et al., 2006; LAGE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010) quanto no Estado do Mato Grosso do Sul (MADRUGA et al., 1980; PELLEGRIN et al., 1999; FAVERO et al., 2001; FONTANA, 2011). Na espécie bovina, a transmissão pode ocorrer de forma indireta por meio de água e solos contaminados por urina, fetos abortados, placenta, secreções uterinas e transmissão venérea como forma direta mais comum (FAINE et al., 1999).

A identificação dos sorovares de *Leptospira spp.* circulantes em uma região geográfica, além de contribuir para o avanço do conhecimento da cadeia epidemiológica da doença, pode ter implicações para seu diagnóstico, aumentando a sensibilidade do teste e maximizando a detecção de animais infectados nos rebanhos, com a inclusão de estirpes autóctones na coleção de antígenos utilizada no diagnóstico. Outro benefício direto do conhecimento dos sorovares mais prováveis refere-se ao potencial aumento da efetividade das vacinas empregadas, com a agregação dos sorovares patogênicos mais frequentemente encontrados nos rebanhos bovinos da região alvo do controle (ARAÚJO, 2005; DELBEN, 2005).

Na cadeia produtiva de bovinos, tanto de corte como de leite, a leptospirose tem como principal impacto o comprometimento do desempenho reprodutivo (VASCONCELLOS et al., 1997), sendo o sorovar Hardjo implicado como causa de abortamento, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos (GROOMS; BOLIN, 2005), mastite e agalaxia (BOLIN et al., 1989).

A região do Pantanal apresenta a maior população bovina de Mato Grosso do Sul, com 1,843 milhão de cabeças (IBGE, 2006), concentrada especialmente no município de Corumbá. A planície pantaneira é um ecossistema complexo, formado por diferentes fitofisionomias, tais como capões, cordilheiras, baías (lagoas permanentes), corixos e vazantes, com uma multiplicidade de complexas funções ecológicas, oferecendo condições ecológicas favoráveis para a manutenção de vários agentes etiológicos, entre os quais a *Leptospira spp.*, por abrigar uma rica biodiversidade de espécies faunísticas, bem como ter o funcionamento de seu ecossistema baseado em um pulso de inundação sazonal (SANTOS et al., 2002).

Apesar de os achados sorológicos da leptospirose na região do Pantanal até o momento terem sido pontuais, estes sugerem uma circulação do agente nos rebanhos bovinos (PELLEGRIN et al., 1999; FAVERO et al., 2001; FONTANA, 2011), que deve ser corroborada com base em estimativa da prevalência da doença, baseada em um desenho amostral robusto e geograficamente abrangente, de modo que permita inferências sobre seu possível impacto na economia regional.

O objetivo deste estudo foi efetuar um levantamento soroepidemiológico da leptospirose bovina na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul, estimando sua prevalência e fatores de risco associados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A leptospirose, como uma síndrome associada à icterícia e à falha renal, foi reportada pela primeira vez por Adolf Weil em 1886 (1886, apud FAINE et al., 1999) e, mais tarde, em 1907. Stimson (1907, apud FAINE et al., 1999) observou organismos espiralados em tecido renal de um paciente com *causa mortis* atribuída à febre amarela, denominando os organismos *Spirochaeta interrogans*.

Em 1914, Inada et al. (1914, apud FAINE et al., 1999) inocularam em um cobaio uma amostra de paciente acometido com a doença de Weil, conseguindo visualizar, pela primeira vez, espiroquetas no tecido hepático. Após outros estudos, encontraram resultados semelhantes em outros pacientes com a mesma doença, denominando o agente etiológico daquela doença *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*.

No Brasil, os primeiros estudos sobre a leptospirose foram realizados por McDowel, com o reconhecimento da *Leptospira* no Estado do Pará. Simultaneamente, Aragão observou a *Leptospira icterohaemorrhagiae* em *Rattus norvegicus* no Estado do Rio de Janeiro (1917, apud JOUGLARD, 2005), mas a publicação pioneira reportando a distribuição da doença e um alerta sobre o risco oferecido pelas condições ecológicas apresentadas pelo País foi realizada somente em 1963, por Magaldi (1963, apud JOUGLARD, 2005).

Noguchi propôs o gênero *Leptospira* após estudar a espiroqueta visualizada por Inada e cepas de outras procedências que foram isoladas de humanos e roedores (SANTA ROSA, 1970). Em 1917, Noguchi (1917, apud LEVETT, 2004) identificou o rato como fonte de infecção para os humanos.

Santa Rosa, em 1970, publicou um levantamento revisando a casuística do diagnóstico de leptospirose realizado pelo Instituto Biológico de São Paulo durante um período de nove anos. Os dados, obtidos do exame de 15.080 soros de bovinos, 3.242 soros suínos e 21.263 soros humanos, por meio do teste de soroaglutinação microscópica, indicaram uma predominância de reações para os sorovares Wolffi, Pomona e Icterohaemorrhagiae, respectivamente (SANTA ROSA, 1970). A importância do sorovar Icterohaemorrhagiae também foi evidenciada em estudo retrospectivo da casuística humana da leptospirose, em pacientes hospitalares com suspeita de leptospirose, no Estado do Rio de Janeiro, no período de 1970 a 1982. Dos 775 casos suspeitos, 76% tiveram seu diagnóstico confirmado e o sorovar Icterohaemorrhagiae foi identificado em 41,3% dos indivíduos, sendo 12,3% dos

resultados inconclusivos (sorovar não determinado). A análise dos fatores de risco indicou uma relação com condições pluviométricas, sexo e idade, sugerindo risco ocupacional e fatores de contágio pela prática de atividades recreacionais. Adicionalmente, o mesmo estudo apontou dois casos de sorologia positiva para o sorovar Grippotyphosa em indivíduos que, presumivelmente, tiveram contato com uma fonte de contágio de natureza silvestre (ANDRADE; BRANDÃO, 1987).

2.2 Etiologia

As leptospiros estão entre as menores bactérias que podem passar através de membrana (GANGADHAR et al., 2006). São consideradas espiroquetas, medem aproximadamente 0,1 mm de diâmetro e 6-20 mm de comprimento. As bactérias do gênero *Leptospira* incluem tanto espécies patogênicas quanto saprófitas e são pertencentes à família *Leptospiraceae* da ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999). As leptospiros são bactérias Gram-negativas, espiraladas, flexíveis, móveis e delgadas, compostas de um cilindro protoplasmático que se enrola em um filamento axial central; seu envelope externo é composto por lipopolissacarídeos (LPS) e mucopéptídeos antigênicos (FAINE et al., 1999).

A visualização das leptospiros pode ser realizada pelo emprego de técnicas como microscopia de campo escuro ou contraste de fase (FAINE et al., 1999), coloração pela prata, conjugados imunocorados com fluoresceína ou imuno-histoquímica (ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

As leptospiros são sensíveis à luz solar direta, aos desinfetantes comuns, aos antissépticos, à dessecação, às variações de pH (inferiores a 6,0 ou superiores a 8,4) e às temperaturas acima de 40 °C. A temperatura considerada ótima para o crescimento é de 28 °C a 30 °C e, em laboratório, podem crescer em temperaturas de até 37 °C, necessitando de pH levemente alcalino, entre 7,2 e 7,6 (FAINE et al., 1999).

O gênero *Leptospira* compreende bactérias morfologicamente similares, mas antigenicamente distintas quando testadas por meio de soroglutinação microscópica, sendo, dessa forma, classificadas em diferentes sorovares. Segundo a classificação taxonômica clássica, com base em sorogrupos, sorovares e patogenicidade, este gênero pode ser dividido em dois grandes grupos: *Leptospira interrogans* (patogênica) e *L. biflexa* (saprófita), resultando em 24 sorogrupos, constituídos por cerca de 250 sorovares de *Leptospiras* patogênicas (FAINE et al., 1999, PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

Em 1987 foi proposta uma nova classificação baseada na hibridização por homologia do DNA. O gênero *Leptospira* foi reclassificado, segundo características genótípicas, em oito genomoespécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. faine*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. santarosai* e *L. weilii*. As leptospirosas saprófitas, ou de vida livre, estão representadas por três genomoespécies: *L. biflexa*, *L. meyeri* e *L. wolbachii* (KMETY; DIKKEN, 1993 apud OIE, 2008).

2.3 Patogenia

O mecanismo de patogenicidade das leptospirosas ainda não é bem compreendido (LANGSTON; HEUTER, 2003, ADLER; MOCTEZUMA, 2009) em virtude da multiplicidade dos sorovares existentes (GANGADHAR et al., 2006); todavia, toxinas e enzimas produzidas parecem estar implicadas na patogenia da doença (LANGSTON; HEUTER, 2003).

A leptospirosas colonizam os túbulos renais e a leptospirose pode ser persistente, apesar de os processos imunológicos estarem ativos no indivíduo (MONAHAN et al., 2009). Com a disponibilidade de técnicas moleculares, permitindo sequenciar o gene de diferentes isolados, Bulach et al. (2006) reportaram que dois isolados de *L. borgpetersenii*, serovar Hardjo, possuíam diferentes fenótipos e virulência, apesar de serem geneticamente idênticos. O genoma da *L. borgpetersenii* é de aproximadamente 700 kb menor que o da *L. interrogans*, o que favorece esta última, que pode sobreviver por mais tempo em ambientes aquáticos até encontrar um novo hospedeiro, o que não ocorre com a *L. borgpetersenii*, que parece estar evoluindo no sentido de uma dependência do hospedeiro para que o ciclo epidemiológico seja mantido (BULACH et al., 2006).

Por meio de pequenos cortes ou abrasões, as leptospirosas penetram no organismo do hospedeiro, via membranas mucosas, pela conjuntiva, porém pode ocorrer uma penetração também pela pele íntegra, quando em condições especiais de dilatação dos poros e persistência de contato com água contaminada (VASCONCELLOS, 2004). Após se multiplicarem no interstício e humores orgânicos (sangue, linfa e liquor), as bactérias vão para a corrente sanguínea até atingirem um nível crítico chamado de fase de bacteremia (leptospiremia) ou septicêmica, o que geralmente ocorre de um a sete dias após a infecção. Após, há a migração e persistência das leptospirosas nos tecidos, principalmente nos túbulos renais proximais e no trato geniturinário feminino (ELLIS, 1984; FAINE et al., 1999).

As leptospirosas podem permanecer nos túbulos renais proximais por períodos de semanas a anos, ou até o final da vida do hospedeiro, como ocorre nos roedores. As leptospirosas não sobrevivem bem em urina ácida, mas mantêm-se em urina alcalina; por esta razão, animais herbívoros, ou aqueles cuja dieta torna a urina alcalina, são importantes como reservatórios da doença (ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

No trato reprodutivo das vacas, as leptospirosas desenvolvem uma infecção placentária, ocorrendo infecção aguda do feto em vacas gestantes e, algumas vezes, podendo a transmissão da leptospirose ser de forma congênita (FAINE et al., 1999).

A infecção pode se apresentar de uma forma aguda ou severa em virtude da septicemia, com toxemia, hemorragia, hepatite, nefrite, meningite, ou como doença crônica, que se caracteriza por aborto, natimortalidade e infertilidade, estando os sinais clínicos e a forma como a doença apresenta-se diretamente relacionados com a espécie hospedeira (FAINE et al., 1999). Na forma crônica em fêmeas bovinas, a infecção pode levar ao abortamento, à ocorrência de natimortos e ao nascimento de bezerros fracos (ELLIS, 1984).

Durante a fase aguda ocorre uma lesão primária no endotélio, levando a uma isquemia localizada, o que resulta em necrose tubular renal, dano hepatocelular, meningite, miosite e placentite. Em casos mais severos ocorrem hemorragias e, frequentemente, deficiência plaquetária (ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

2.4 Sinais clínicos

A leptospirose bovina pode se apresentar de forma inaparente, aguda, febril e severa. A manifestação clínica não é específica ou patognomônica (FAINE et al., 1999). Nos bovinos pode haver duas fases da doença: uma aguda, no início da infecção, que coincide com a bacteremia, e outra crônica, que afeta de forma aparente o trato reprodutivo (ELLIS, 1984).

Na forma aguda, nos bovinos, a infecção pode ter uma apresentação severa (ELLIS, 1994), sendo que o sorovar Pomona pode levar o animal à morte, apresentando ligeira icterícia, acentuado acúmulo de líquido avermelhado e serogelatinoso em diversas regiões do corpo, repleção de urina cor de cereja na bexiga (LEMOS, 2005). Na fase crônica, ocasionada pelo sorovar Hardjo, há associação com infecção fetal em vacas prenhes, com a ocorrência de abortos, natimortalidade ou nascimento de bezerros prematuros e fracos. Os recém-nascidos que foram infectados de forma congênita são debilitados e afetados por degeneração do fígado e/ou rins, sendo propensos a infecções secundárias, e os que sobrevivem passam a ser portadores crônicos (ELLIS, 1994).

Quanto à severidade da doença, esta pode depender da idade do animal, de sua imunidade, tipo de manejo, período da gestação, do sorovar infectante e da concentração e virulência da *Leptospira* (FAINE et al., 1999).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose bovina é complexo em virtude das manifestações clínicas não serem patognomônicas, e, também, pela dificuldade de acesso a testes rápidos, sensíveis e de fácil execução (FAINE et al., 1999), sendo que o conhecimento da epidemiologia da doença poderá auxiliar no diagnóstico presuntivo de rebanhos infectados (GUIMARÃES, 1982).

Dentre os métodos considerados diretos para o diagnóstico da leptospirose, podem ser incluídas a microscopia de campo escuro, cultura, inoculação de animais em laboratório, histopatologia, visualização em campo claro com corantes especiais, imuno-histoquímica e imunofluorescência direta (FAINE et al., 1999), bem como os métodos moleculares de identificação do DNA bacteriano (LEVETT, 2004).

Os animais de laboratório têm grande importância e utilidade para isolamento da *Leptospira spp*, inclusive como meio de manutenção de estirpes que não se adaptam ao cultivo em laboratório. As espécies preferenciais são cobaias ou *hamsters* jovens, inoculados pela via intraperitoneal com sangue, triturados de órgãos ou urina de animais suspeitos ou comprovadamente infectados pelo agente (SANTA ROSA, 1969/1970).

A microscopia de campo escuro pode detectar a *Leptospira spp* em tecidos ou humores orgânicos, mas isso dependerá da fase evolutiva da doença: leptospirêmica ou leptospirúrica. Esse pode ser considerado um método rápido, porém com baixa sensibilidade e especificidade, pois a presença de um artefato no campo visual pode causar confusão na identificação do microrganismo (BOLIN, 1996).

Para cultivo e isolamento das leptospirosas são utilizados meios enriquecidos com soro de coelho ou albumina sérica bovina (BSA), além de meios livres de proteínas. O meio semissólido, com a adição de 0,2% de ágar, é mais utilizado para isolamento de estirpes e manutenção de culturas de estoque. Nesse meio, o crescimento é visualizado pela formação de um ou mais anéis de crescimento (anel de Dinger). A ausência de anéis não significa, necessariamente, ausência de leptospirosas. O meio sólido é utilizado para clonar estirpes e para isolar leptospirosas de fontes contaminadas (FAINE, 1982), não sendo utilizado no diagnóstico de rotina. A temperatura ótima para o crescimento de leptospirosas saprófitas ou patogênicas

varia de 28 °C a 30 °C. O pH ótimo para crescimento está entre 7,2 e 7,6; sendo que condições alcalinas são mais bem toleradas que condições ácidas (FAINE et al., 1999).

O teste sorológico denominado soroaglutinação microscópica (SAM) é o método mais empregado no diagnóstico da doença, sendo amplamente aceito como padrão ouro e de referência internacional (BRASIL, 1995). A SAM tem boa especificidade e pode indicar o sorovar infectante. Os antígenos selecionados para compor a coleção de antígenos do teste SAM devem incluir estirpes representativas de cada sorogrupo conhecido que existe na região de estudo, aumentando, assim, a sensibilidade de detecção dos anticorpos antileptospira (FAINE et al., 1999; OIE, 2008).

Anticorpos IgM e IgG reagem com o antígeno vivo, determinando a ocorrência de aglutinações visíveis em microscopia de campo escuro (LEVETT, 2004). Podem, entretanto, ocorrer coaglutinações, isto é, reações contra mais de um sorovar, podendo estes pertencer ao mesmo sorogrupo, ou não. Para a interpretação de tais resultados, o sorovar infectante mais provável é o que apresenta o título mais elevado e persistente. Também existem as reações paradoxais, quando, eventualmente, títulos mais elevados são obtidos com um sorovar distinto daquele que está de fato infectando o animal (VASCONCELLOS, 2004).

Na interpretação do resultado da SAM, animais vacinados contra leptospirose podem ter anticorpos contra os sorovares presentes na vacina, devendo ser considerada a possível interferência de anticorpos pós-vacinais. A resposta de anticorpos aglutinantes pós-vacinais em bovinos persiste por até seis meses (BOLIN, 1996). A vacina pode mascarar a doença no rebanho, em particular quando a infecção é atribuída ao sorovar Hardjo, por contribuir significativamente para o número de animais soropositivos no rebanho (OIE, 2008).

A inclusão de amostras isoladas no País (autóctones), em coleções de antígenos utilizadas no diagnóstico da leptospirose, tem demonstrado aumentar a sensibilidade do teste de soroaglutinação microscópica. Os títulos observados para as estirpes autóctones são geralmente mais elevados que os sorovares de referência mantidos em laboratório (LEVETT 2004; OLIVEIRA, 2003; SARMENTO et al., 2002).

Pellegrin et al. (1999) demonstraram um grande número de reações positivas para a amostra Cantagalo (Hardjo - CTG), sendo esta significativamente maior que quando era utilizada somente a amostra Hardjoprajitno integrante da coleção de antígenos utilizada no diagnóstico de rotina. No mesmo trabalho, os sorovares para os mais frequentes foram o Hardjo-CTG (59,52%), Hardjoprajitno (21,28%), Wolffi (23,13%) e Sejroe (24,82%).

Sarmento et al. (2002) testaram uma amostra de conveniência obtida de 109 rebanhos, dos quais foram coletados 9.820 soros bovinos oriundos de 84 municípios em oito estados do

País. Para o diagnóstico foi utilizada a SAM, empregando, além da coleção de antígenos de leptospiros recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), uma coleção de antígenos composta por representantes de dez isolados autóctones, mantidos no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). A utilização da coleção de representantes dos sorovares autóctones demonstrou elevar a sensibilidade individual de detecção do agente em 6%, sendo o sorovar Guaricura o mais provável em alguns dos estados, superando, inclusive, o sorovar Hardjo.

Outros métodos indiretos, como o Enzyme-linked Immunoassay (Elisa), de fixação de complemento, testes de hemoaglutinação ou imunofluorescência podem também ser utilizados no diagnóstico da leptospirose (FAINE et al., 1999), embora não sejam empregados como testes de rotina.

2.6 Epidemiologia

A leptospirose tem sido considerada uma doença emergente, associada à exposição ocupacional e às atividades recreativas e esportivas vinculadas ao ecoturismo e turismo de aventura e natureza, nos quais o risco de contato com as diversas fontes de infecção pode ocorrer de forma mais frequente (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Regiões submetidas a condições inundáveis, como a planície pantaneira, oferecem condições climáticas favoráveis à ocorrência da leptospirose, uma vez que a doença está fortemente associada a períodos de alta pluviosidade (ACHA; SZYFRES, 1986; PLANK; DEAN, 2000), ao clima quente e úmido, ao pH próximo à neutralidade (LANGONI, 2000) e à presença de hospedeiros adequados.

A transmissão da leptospirose depende das condições favoráveis à sobrevivência da leptospira no meio, do número de animais portadores e da disponibilidade de animais susceptíveis na população, do tempo que esses animais positivos permanecem como reservatórios e do grau de contato entre os hospedeiros de manutenção e hospedeiros acidentais (LEVETT, 2004).

As leptospiros patogênicas são capazes de infectar animais domésticos, silvestres e o homem. O quadro clínico varia de uma infecção subclínica até uma forma da doença grave e fatal. Os casos subclínicos são os mais importantes quando se trata da forma zoonótica, pois o estado do portador é considerado crônico (FAINE et al., 1999).

Dentre os animais domésticos, os bovinos, suínos e caninos são as espécies mais afetadas, e, dentre os animais silvestres, os roedores e marsupiais são os principais reservatórios do agente (Quadro 1). Os roedores, principalmente o *Rattus norvegicus*, são considerados os principais reservatórios, pois alojam as leptospirosas, especialmente as pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, nos rins (FAINE et al., 1999).

Quadro 1 - Reservatórios preferenciais dos sorovares de *Leptospira spp* mais frequentemente reportados

Reservatório	Sorovar
Bovinos	Hardjo, Pomona
Cães	Canicola
Equinos	Bratislava
Ovinos	Hardjo
Camundongos (<i>Mus musculus</i>)	Ballum, Arborea, Bim
Marsupiais	Grippotyphosa
Morcegos	Cynopteri, Wolffi
Procionídeos (guaxinim)	Grippotyphosa
Suínos	Pomona, Tarassovi

Fonte: Adaptado de Bharti et al. (2003)

Nas regiões tropicais e subtropicais, as taxas de ocorrência de leptospirose são maiores quando comparadas às regiões frias e secas. Em grande parte da América tropical e subtropical, as condições climáticas existentes facilitam a ocorrência de casos de transmissão de leptospirose em virtude das abundantes precipitações pluviométricas, às altas temperaturas, à variedade de espécies hospedeiras (Quadro 1), à modificação biológica da população, ao comportamento e à ecologia das espiroquetas e seus hospedeiros (GUIMARÃES, 1982; LEVETT, 2001).

A incidência de leptospirose é sazonal, tendo picos no verão ou outono em regiões temperadas, onde a temperatura é um fator limitante na sobrevivência das leptospirosas. Já em regiões de clima tropical, durante estação chuvosa, a rápida dessecação impede a sobrevivência dos microrganismos (LEVETT, 2004).

As leptospirosas podem sobreviver por até 183 dias em solos úmidos, e menos de 30 minutos em solos secos. São sensíveis a desinfetantes tradicionais, assim como ao calor e à

dessecação, mostrando também resistência a alguns antibióticos, como sulfamidas e cloranfenicol (FAINE et al., 1999).

2.6.1 Leptospirose bovina no Brasil

Estudos epidemiológicos para estimativas de distribuição da leptospirose têm sido realizados há algumas décadas, tanto em rebanhos bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul (MADRUGA et al., 1980; PELLEGRIN et al., 1999; FAVERO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2009) quanto em outros estados do Brasil (LANGONI et al., 2000; HOMEM et al. 2000; FAVERO et al., 2001; THOMPSON et al.; 2006 LAGE et al., 2007), com maior ou menor abrangência geográfica.

Em um estudo realizado por Pellegrin et al. (1999), na sub-região da Nhecolândia do Pantanal Sul-Mato-Grossense, foram amostrados 28 rebanhos e 756 amostras de soro de bovinos de ambos os sexos, sendo estimada uma prevalência de anticorpos anti-*Leptospira spp* em 38,88% dos animais. Os sorovares mais frequentes foram o Hardjo (amostra Cantagalo), responsável por 59,52% das reações positivas, Hardjo (hardjoprajtino) (21,28%), Wolffi (23,13%) e Sejroe (24,82%). Com relação aos fatores de risco para a leptospirose na mesma região do estudo, os autores apontaram que a frequência de animais soropositivos estava relacionada com o tamanho da propriedade. Na região, considerando que o tamanho da propriedade é dependente do regime hidrológico, quanto maior a região alagada de uma fazenda, maior a área necessária para a produção, do contrário não se torna economicamente viável; então, as variáveis presença de áreas alagadas e tamanho de propriedade estão bastante relacionadas (PELLEGRIN et al., 1999).

Em um estudo no Estado do Mato Grosso do Sul, Figueiredo et al. (2009) analisaram 2.601 amostras de soro sanguíneo de bovinos de corte e observaram uma prevalência de 97,03% da leptospirose bovina em 98,8% das fêmeas testadas e em 85,2% dos rebanhos, apontando o sorovar Hardjo (65,6%) como o mais provável (65,6%), seguido do sorovar Wolffi (12,3%).

Na microrregião de Goiás, foram amostrados 20 rebanhos e 426 amostras de soros de bovinos leiteiros por meio de soroaglutinação microscópica, com uma estimativa de prevalência de 81,90%, não sendo, contudo, identificados os fatores de risco associados à presença de soropositividade nos rebanhos amostrados (JULIANO et al., 2000).

Estudos epidemiológicos para estimativas de prevalência devem ser baseados em amostragem aleatória desenhada para tal finalidade, sendo o tamanho da amostra baseado na

prevalência esperada, nível de confiança e no erro aceitável (MEDRONHO et al., 2009). A execução de inquéritos transversais demanda elevado aporte de recursos materiais, humanos e financeiros, visto que as coletas devem ser executadas no menor prazo de tempo possível, sendo que a otimização do uso das amostras obtidas para ampliar o conhecimento do estado sanitário dos rebanhos tem sido uma prática cada vez mais comum (CASTRO et al., 2008; OLIVEIRA, 2010; SILVA, 2012; HASHIMOTO et al., 2012).

Em 2008, Castro et al. realizaram um estudo com inquérito epidemiológico em sete circuitos pecuários no Estado de São Paulo, avaliando 8.216 fêmeas bovinas em idade reprodutiva, estimando uma prevalência de 49,4% de soroprevalência individual, indicando os sorovares Hardjo e Wolffi como os mais predominantes, com 46% e 21% de positividade, respectivamente. A amostragem baseou-se no delineamento estatístico utilizado para avaliação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), no Estado de São Paulo. A prevalência de rebanho, estimada em 71,3%, indicou que a leptospirose está distribuída no estado, independentemente de fatores de risco associados ao rebanho, como tipo de exploração e práticas de manejo reprodutivas. Os sorovares Hardjo (46%) e sua associação com o sorovar Wolffi (21%) foram mais prevalentes, seguidos pelos sorovares Shermani (8,9%), Autumnalis (4,4%) e Grippytyphosa (3,9%).

Oliveira (2010) avaliou 1.414 propriedades e 10.823 soros de fêmeas em idade reprodutiva de rebanhos bovinos do Estado da Bahia, estimando as prevalências de rebanho e individual em 77,93% e 45,42%, respectivamente, indicando uma diferença significativa entre as prevalências observadas nos diferentes circuitos pecuários amostrados. Neste trabalho, evidenciou-se a predominância de reações para os sorovares Hardjo (hardjoprajitno) em 34,39% dos rebanhos, e fatores de risco tais como compra de reprodutores, presença de suínos e de cervídeos na propriedade, áreas alagadiças, aluguel de pasto e raças especializadas.

Silva et al., em 2012, estimaram uma prevalência para leptospirose em 35,94% do total de 2.582 soros provenientes de fêmeas bovinas e 64,81% de 573 propriedades analisadas nos quatro circuitos pecuários do Estado do Maranhão. Os sorovares Hardjo e Wolffi foram os mais frequentes em todo o estado e o circuito III foi o que apresentou menor prevalência. Os fatores de risco associados à presença de animais sorologicamente positivos foram a presença de equinos, a presença de capivaras na propriedade e o tamanho dos rebanhos (maior ou igual a 32 fêmeas adultas).

Em 2012, Hashimoto et al. realizaram um levantamento epidemiológico transversal, com uma amostragem delineada, para estimativa de prevalência da brucelose bovina no

Estado do Paraná. Foram amostradas 274 propriedades e 1.800 fêmeas em idade reprodutiva, e estimada uma prevalência de 66,06% de rebanhos positivos. Os fatores de risco para presença de animais infectados estiveram associados ao tamanho do rebanho (maior ou igual a 43 bovinos), compra de reprodutores, aluguel de pasto, presença de piquete de parição. Uma análise exclusiva de fatores de risco associados à presença do sorovar Hardjo – o tamanho do rebanho (maior que 43 bovinos), compra de reprodutores, aluguel de pasto e presença de equinos – indicou como significativa a presença de animais positivos para esse sorovar nos rebanhos estudados.

2.7 Controle

O controle da leptospirose é baseado em imunização do rebanho e tratamento dos portadores renais por meio dos antibióticos de eleição. Os suínos devem ser separados de bovinos, ovinos e caprinos, pois esses animais apresentam leptospirúria por longo período (FAINE et al., 1999).

Embora a vacinação não tenha sua eficácia confirmada, acredita-se que possa reduzir alguns fatores de risco e proporcionar algum grau de segurança. Em um rebanho fechado, a vacinação periódica anual, ou semestral, no caso de rebanhos abertos, pode ser eficiente para o controle, considerando que a imunidade vacinal tem eficácia por, no mínimo, seis meses (OIE, 2008).

Os sinais clínicos da leptospirose aguda poderão melhorar seguindo-se o tratamento com estreptomicina (12,5 mg/kg, duas vezes ao dia, por três dias consecutivos), podendo ser empregada uma associação com ampicilina ou com elevadas doses de benzilpenicilina. Para casos em que o animal apresenta-se no estado de portador renal crônico, causado pelo sorovar Pomona e outros, acredita-se que uma única dose de estreptomicina (25 mg/kg) remova o estado do portador (FAINE et al., 1999).

O controle de reservatórios tem sido realizado com o emprego de diversos recursos: a) medidas ofensivas, como aplicação de procedimentos químicos, mecânicos e biológicos; b) medidas defensivas baseadas no uso de instalações à prova de roedores, principalmente as destinadas ao preparo e armazenagem de alimentos; c) medidas de saneamento, que têm mostrado grande eficiência e que objetivam eliminar as condições ambientais favoráveis à proliferação destes micro-organismos (GUIMARÃES et al., 1982).

O controle da leptospirose é dependente do manejo e/ou eliminação de diferentes fatores que interagem na ocorrência de um caso da doença no animal ou no rebanho, portanto

as medidas de prevenção e/ou controle deverão ser direcionadas, além do controle de reservatórios, também para a melhoria das condições de proteção dos trabalhadores em risco ocupacional, das condições higiênico-sanitárias da população e de medidas corretivas no ambiente (BRASIL, 1995).

Considerando a importância da bovinocultura de corte na região do Pantanal, com ênfase na produção de bezerros, torna-se fundamental um diagnóstico sistemático e o controle da leptospirose, visando minimizar perdas que afetem os índices reprodutivos do rebanho. A identificação de reservatórios silvestres de *Leptospira spp.*, além de contribuir para o avanço do conhecimento da cadeia epidemiológica na região, tem implicações no controle da doença na região, hoje baseada, única e exclusivamente, na imunoprofilaxia com vacinas contendo apenas os sorovares mais frequentemente encontrados em bovinos.

3 REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles communes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. p. 502-526.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 140, n. 2, p. 287-296, 2009.

ALMEIDA, I. L. et al. **Introdução de tecnologias na criação de bovino de corte no Pantanal** – sub-região dos Paiaguás. Corumbá: Embrapa/CPAP, 1996.

ANDRADE, J. A.; BRANDÃO, A. R. Contribuição ao conhecimento da epidemiologia da leptospirose humana, com especial referência ao Grande Rio, Brasil, no período de 1970 a 1982. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 1, p. 91-100, 1987.

ARAÚJO, V. E. M. et al. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**. London, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003. Disponível em: <<http://infection.thelancet.com>>. Acesso em: 11 jul. 2013.

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

BOLIN, C.A. et al. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection on pregnant cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 50, n. 1, p. 161-165, 1989.

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

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Resolução nº 05 de 10 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 198, p. 48-65, 11 out. 2002.

BULACH, D. M. L. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 39, p. 14560-5, 2006.

CADAVID GARCIA, E. A. **Análise técnico-econômica da pecuária bovina do Pantanal**. Sub-regiões da Nhecolândia e Paiaguá. Corumbá: Embrapa/CPAP, 2006.

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

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of leptospira strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 760–768, 2009.

DELBEN, A. C. B. **Purificação, caracterização e avaliação da capacidade imunogênica do lipopolissacarídeo (LPS) de *Leptospira spp* isolada no Brasil associado ao hidróxido de alumínio ou monofosforil lipídio A como adjuvantes**. 2004. 117 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2005.

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

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

EVANGELISTA, K. V.; COBURT, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982. 171p. (WHO off set publication, 67).

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci, 1999.

FAVERO, S. et al. Leptospirose bovina - variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.

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

FONTANA, I. **Avaliação do porco monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do Pantanal Sul-Mato-Grossense**. 2011, 62f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de Brasília, Brasília, DF.

GANGADHAR, N. L. et al. Leptospirosis: an enigma of zoonosis for the developing world. **Infectious Diseases Journal**, v. 15, n. 1, p. 20-24, 2006.

GIRALDI, I. N. **Avaliação da infecção por leptospira em fêmeas bovinas enviadas ao abate no norte do Paraná, através de diferentes técnicas diagnósticas**. 2003. 75f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo.

GROOMS, D. L.; BOLIN, C. A. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea virus and *Leptospira* spp. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 463-472, 2005.

GUIMARÃES, M. C. et al. Epidemiologia e controle de leptospirose em bovinos. Papel do portador e o seu controle terapêutico. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 6-7, n. 1-4, p. 21-34, 1982.

HASHIMOTO, V. Y. et al. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012.

HOMEM, V. S. F. et al. Leptospirose bovina em Uruará, PA, município da Amazônia oriental. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 1-8, 2000.

IBGE. **Estabelecimentos e efetivo bovino, total e diferença entre os Censos Agropecuários de 1996 e 2006, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação - 1996/2006**. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/tab_brasil/tab16.pdf. Acesso em: 22 jun. 2012.

JOUGLARD, S. D. D. **Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de leptospira spp. por seqüenciamento do 16s rDNA e análise de VNTR**. 2005. 71f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul.

JULIANO, R. S. et al. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 857-862, 2000.

LAGE A. P., et al. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 185-190, 2007.

LANGONI H., et al. 2000. Perfil sorológico da Leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 67 (1):37-41

LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis a re-emerging zoonotic disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 2, p. 791-807, 2003.

LEMOS, R. A. A.; ALMEIDA, A. P. M. G. Leptospirose bovina. In: LEMOS, R. A. A. (Org.). **Leptospirose bovina, campilobacteriose genital bovina, tricomose bovina, neosporose em bovinos**. Campo Grande: UFMS, 2005.

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

LEVETT, P. N. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 435-448, 2004.

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

MADRUGA C. R.; AYCARDI, E.; PUTT N. Frequência de aglutininas anti-leptospira em bovinos de corte na região Sul de Cerrado do estado de Mato Grosso. **Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 32, n. 2, p. 245-249, 1980.

MEDRONHO, R. A. et al. **Epidemiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

MONAHAN, M. A.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Review paper: host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 792-799, 2009.

OIE. World organisation for animal health. **Leptospirosis**. Chapter 2.1.9. 2008. Disponível em:

<html:http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf>.

Acesso em: 11 jul. 2013.

OLIVEIRA, F. C. S. et al. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398-402, 2010.

OLIVEIRA, R. C. **Utilização de estirpe local de *Leptospira spp* na prova de soroaglutinação microscópica para a leptospirose canina**. 2003. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná.

PALANIAPPAN, R.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.

PELLEGRIN, A. O. et al. Prevalência de leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. **Comunicado Técnico** – Embrapa Pantanal. Corumbá, n. 22, p. 1-9, 1999.

PLANK, R., DEAN D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1265-1276, Aug. 2000.

SANTA ROSA, C. A. et al. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 29/30, p. 19-27, 1969/1970.

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

SANTOS, S. A. et al. Sistema de produção de gado de corte do Pantanal. **Sistemas de Produção – Embrapa Pantanal**, n. 1, 2002.

SARMENTO, A. M. C., et al. Emprego de estirpes *Leptospira spp.* isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 601-606, 2002.

SILVA, F. J. et al. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 303-312, 2012.

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

VASCONCELLOS S. A. Laboratory diagnosis of leptospirosis in animals. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE LEPTOSPIRA Y LEPTOSPIROSIS EN LAS AMERICAS. 2004, México. **Anales...** México, DC: División de Educación Continua, Universidad Nacional Autónoma de México, 2004. v.1, 70-76.

VASCONCELLOS, S. A. et al. Leptospirose bovina: níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos bovinos nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, n. 2, p. 7-15, 1997.

VIEIRA, A. S. et al. Identificação de mamíferos silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense portadores de *Leptospira spp.* **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 373-380, 2013.

4 ARTIGO

Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul

Aline Fernanda Miashiro¹, Silvio Arruda Vasconcellos², Zenaide Maria de Morais³, Gisele Oliveira de Souza², Hilda Bottene⁴, Jamil Manoel Leal Filho⁴, Aline de Oliveira Figueiredo⁵, Aiesca Oliveira Pellegrin⁶

Resumo

Foi realizado um estudo epidemiológico da leptospirose em fêmeas acima de 24 meses, provenientes de 246 rebanhos, e 2.766 animais amostrados aleatoriamente nos nove municípios que compõem a região do Pantanal de Mato Grosso do Sul, bem como identificados os fatores de risco associados à doença. As amostras de sangue foram coletadas no período de setembro a novembro de 2009 e examinadas pelo teste de aglutinação microscópica ante uma coleção de 24 antígenos vivos de *Leptospira spp*, representantes dos sorovares Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Batavie, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panamá, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Sentot, Andamana e Patoc. Adicionalmente, representantes de doze estirpes de leptospiros isoladas no Brasil foram adicionados à coleção de antígenos do teste de soroaglutinação microscópica (MAT). A prevalência aparente foi de 66% e a prevalência real de animais infectados, de 79,80%, com intervalo de confiança IC 95% (78,3- 81,3) e 241 rebanhos apresentando pelo menos um animal reagente. Os sorovares mais prováveis foram o Hardjo seguido pelo Wolffi. Os resultados demonstram que a leptospirose bovina continua presente no Pantanal, com alta prevalência, tanto de rebanhos quanto individual, sendo os principais fatores de risco para a doença o tipo de exploração e a raça.

¹ Mestranda do Programa Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Cidade Universitária, Campo Grande, MS 79070-900.

² Laboratório de zoonoses bacterianas. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

³ Laboratório de zoonoses bacterianas. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

⁴ Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (Iagro), Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

⁵ Superintendência Federal de Agricultura, Campo Grande, MS.

⁶ Embrapa Pantanal. Endereço para correspondência: aiesca.pellegrin@embrapa.br.

Palavras-chave: Leptospirose. Bovinos. Epidemiologia. Pantanal.

Abstract

This is an epidemiological study of leptospirosis in 24 month-old females from 246 herds. Two thousand, seven hundred and sixty six (2,766) animals were randomly sampled in the nine counties comprising the region of Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. The risk factors associated with the disease were also identified. Blood samples were collected from September to November 2009 and examined by microscopic agglutination test against a collection of 24 live antigens of *Leptospira spp*, representatives of serovars Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Batavie, Canicola Whitcombi, Cynopteri, Grippytyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Sentot, Andamana, and Patoc. Additionally, twelve representatives of *Leptospira* strains isolated in Brazil were added to the collection of antigens for the microscopic agglutination test (MAT). The apparent prevalence was 66% and the actual prevalence of infected animals was 79.80%, with a confidence interval of 95% (78.3 to 81.3) and 241 herds having at least one reactive animal. The most likely serovars were Hardjo followed by Wolffi. Results show that bovine leptospirosis is still present in Pantanal, with high prevalence, both as animals and herds, the main risk factors for the disease being the type of cattle farming and race.

Keywords: Leptospirosis. Cattle herds. Epidemiology. Pantanal.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de distribuição cosmopolita, já tendo sido diagnosticada em animais de todos os continentes e países, exceto nas regiões polares (BLAHA, 1995). A enfermidade tem alta prevalência em países de clima tropical em decorrência de fatores ambientais representados, principalmente, por grandes precipitações pluviais e tipo de solo: neutro ou alcalino (ACHA; SZYFRES, 1986).

O Pantanal Mato-Grossense é uma região que possui condições ecológicas de temperatura e pluviosidade altamente favoráveis à ocorrência da leptospirose bovina (FAINE, 1982; GARCIA; CASTRO, 1986; LINS; LOPEZ; MAROJA, 1986). A evidência sorológica da infecção pela *Leptospira spp* já tem sido evidenciada no Mato Grosso do Sul em inquérito epidemiológico no qual foi estimada a prevalência de 96,5% de rebanhos positivos e em

98,8% de fêmeas em idade reprodutiva (FIGUEIREDO et al., 2009). No Pantanal, estudos soropidemiológicos estimaram frequências de anticorpos para *Leptospira spp* tanto em bovinos de corte (PELLEGRIN; SERENO; FIGUEIREDO, 1992; PELLEGRIN et al., 1999) quanto em animais silvestres (GIRIO et al., 2003; MATHIAS et al.; VIEIRA et al., 2011), sendo detectado o sorovar Hardjo, amostra CTG (Cantagalo) (PELLEGRIN et al., 1999), como o mais provável em bovinos, e os sorovares Wolffii e Pomona em veados campeiros; estes últimos, também encontrados, respectivamente, por Girio et al. (2003) e Vieira et al. (2011).

Levantamentos epidemiológicos para estimativas de prevalência, que permitam inferências para uma dada população e tomada de decisão, devem ser baseados em amostragem probabilística desenhada para tal finalidade, sendo o tamanho da amostra baseado na prevalência esperada, nível de confiança e no erro aceitável (MEDRONHO et al., 2009). A execução de inquéritos transversais demanda elevado aporte de recursos materiais, humanos e financeiros, visto que as coletas devem ser executadas no menor prazo de tempo possível, sendo que a otimização do uso das amostras obtidas para ampliar o conhecimento do estado sanitário dos rebanhos tem sido uma prática cada vez mais comum (CASTRO et al., 2008; OLIVEIRA, 2010; SILVA, 2012; HASHIMOTO et al., 2012).

A identificação dos sorovares mais prováveis nos rebanhos estudados é fundamental para a tomada de decisão quanto à melhor estratégia de controle, principalmente no que se refere à escolha da composição dos imunógenos a serem utilizados. Nos diversos levantamentos soropidemiológicos realizados em bovinos, a predominância de reações para o sorovar Hardjo tem confirmado essa espécie como o hospedeiro preferencial deste sorovar (ELLIS, 1994) atuando como seu reservatório e disseminador junto à população susceptível (ARMATREDJO; CAMPBELL, 1975).

A inclusão de amostras isoladas no País (autóctones) em coleções de antígenos utilizadas no diagnóstico da leptospirose tem demonstrado aumentar a sensibilidade do teste de soroaglutinação microscópica. Os títulos observados para as estirpes autóctones são geralmente mais elevados que os sorovares de referência mantidos em laboratório (LEVETT, 2001; OLIVEIRA, 2003; SARMENTO et al., 2002).

O abortamento é a principal manifestação clínica da leptospirose crônica em rebanhos bovinos e, frequentemente, o único sinal observado. Em propriedades com grande número de animais, distribuídos em áreas extensas e com poucas subdivisões, ele dificilmente é registrado, permitindo a manutenção do agente no rebanho, o que foi apontado em recente levantamento realizado no estado do Mato Grosso do Sul (FIGUEIREDO et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência de anticorpos antileptospira em uma amostragem probabilística de rebanhos e fêmeas bovinas em idade reprodutiva, oriundas de rebanhos bovinos da região do Pantanal, bem como identificar os principais fatores de risco relacionados à doença.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul, em uma área composta por nove municípios e 6.320 propriedades, apresentando um total de 2.157.468 fêmeas com mais de 24 meses. Essa região foi denominada Estrato 1 do Estado de Mato Grosso do Sul (MS) na estratificação utilizada para a realização do inquérito epidemiológico para brucelose e tuberculose, cujas amostras foram utilizadas também no presente trabalho. O Pantanal sul-mato-grossense é constituído por uma área de 70.215 km², o que representa 19,7% do Estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2003), sendo considerado uma região eminentemente de cria de bezerros em virtude de suas peculiaridades ambientais.

Amostragem

Para o estrato do Pantanal, foi realizada uma amostragem aleatória de rebanhos, baseada em uma prevalência esperada de 80%, adaptada de Favero et al. (2001), nível de confiança de 95% e erro de 5%, totalizando amostras de 246 propriedades. A amostragem foi realizada em dois estágios, sendo o rebanho considerado a unidade primária e os animais, dentro de cada rebanho, as unidades secundárias (NOORDHUIZEN et al., 1997).

No sorteio das propriedades foi utilizada a listagem das fichas sanitárias fornecidas pela Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (Iagro) e metodologia de amostragem descrita por Figueiredo et al., (2009).

A seleção das fêmeas foi feita de forma aleatória, empregando-se o método de amostragem aleatória simples ou sistemática. A escolha por um dos métodos foi definida dividindo o total de fêmeas com idade igual ou superior a dois anos existentes na propriedade, pelo total de fêmeas a serem amostradas. Para resultados inferiores a dois, foi empregado o método de amostragem aleatória simples; nos casos em que o resultado era superior a dois, foi empregado o método de amostragem aleatória sistemática. Embora a amostragem tenha indicado um número de 2.601 fêmeas a serem colhidas, foram testados 2.766 animais, visando garantir problemas relativos à perda de amostras.

As amostras de sangue foram colhidas no período de setembro a novembro de 2009, por punção jugular, com agulha descartável, uma para cada animal, e transportadas para o Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais (Laddan), da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul (Iagro). Os soros obtidos foram estocados a -20 °C e depois submetidos ao teste de soroprecipitação microscópica de leptospirose, no Laboratório de Zoonoses bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

Para a realização do diagnóstico de leptospirose foi utilizada a técnica descrita anteriormente por Galton et al. (1965) e Cole, Sulzer e Pursell (1973), empregando uma coleção de antígenos vivos, composta por representantes de 22 sorovares patogênicos (Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Batavie, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi e Sentot) e dois sorovares saprófitas (Andamana, Patoc). Esses antígenos compõem a coleção utilizada no diagnóstico de rotina do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo. Visando aumentar a sensibilidade de detecção da infecção na região estudada, foi também utilizada uma coleção representada por antígenos vivos representantes de 12 sorovares patogênicos, isolados de animais domésticos e silvestres provenientes de várias regiões do Brasil (Brasiliensis, Pomona, Guaricura, Copenhageni, Canicola (canino), Canicola (suíno), Canicola (bovino), Bananal (capivara), Pomona (suíno), e uma provável espécie nova ainda não identificada, a primeira isolada, obtida no Pantanal, da espécie *Cerdocyum thous* (lobinho) na mesma região de estudo desse trabalho. Os antígenos foram mantidos a 28 °C em estufa bacteriológica BOD, de 5 a 15 dias em meio suplementado com de soro de coelho, preparado no próprio laboratório. As culturas não apresentavam contaminação e autoaglutinação.

Para a detecção da presença de anticorpos contra *Leptospira spp* foi utilizada a técnica de soroprecipitação microscópica (SAM). Primeiro, as amostras passaram por uma triagem, na qual foram consideradas reagentes amostras com diluição igual ou superior a 1:100, com mínimo de 50% de aglutinação em microscopia de campo escuro. Após a triagem, as amostras reagentes foram tituladas. Para determinação do sorovar mais provável, foram considerados aqueles que apresentaram maior título, sendo desconsiderados da análise quando o título mais alto foi idêntico para dois ou mais sorovares (VASCONCELLOS et al., 1997).

Análise dos dados

As prevalências aparente (Pa) e real (Pr) para animais, bem como o intervalo de confiança (IC), foram calculadas conforme Martin, Meek e Willeberg (1987). A Pr foi estimada ajustando-se o valor de Pa obtido para a especificidade (0,97) e sensibilidade (0,82) do teste de SAM utilizadas anteriormente por Figueiredo et al. (2009).

Foram estimadas a prevalência aparente de rebanho (PaR), de acordo com Martin, Meek e Willeberg (1987), assim como os intervalos de confiança (IC) das prevalências aparente e real de animais e de rebanhos foram calculados para uma confiança de 95%, de acordo com os mesmo autores.

QUESTIONÁRIO

Em cada propriedade amostrada, foram realizadas entrevistas com a finalidade de levantamento de fatores de risco para a doença na região estudada. As variáveis de risco foram distribuídas em uma tabela e analisadas pelo teste de Qui Quadrado (χ^2) ou pelo teste exato de Fisher, quando indicado (SAMPALIO, 1998). As variáveis analisadas compreendiam tipo de exploração (corte, leite, misto), raça dos animais (zebu, europeu de leite, europeu de corte, outras), número de matrizes com idades iguais ou superiores a 24 meses, tipo de criação (extensivo, intensivo, semiconfinado), uso de pasto comum e arrendamento de pasto, piquete maternidade, dentre outras (Anexo 1).

RESULTADOS

A prevalência aparente de rebanhos foi de 98%, com 241 dos 246 rebanhos testados apresentando pelo menos um animal positivo ao teste de soroaglutinação microscópica. A prevalência real de rebanhos foi de 97%, considerando-se uma sensibilidade de rebanho e especificidade de rebanho de 100% e 69,4%, respectivamente. A prevalência aparente de animais foi de 66%, e a prevalência real de animais infectados foi de 79,80%, com intervalo de confiança (IC) 95% (78,3-81,3), considerando-se uma sensibilidade e especificidade individual do teste de soroaglutinação microscópica, respectivamente, de 82% e 97%. Foram estimados os valores preditivos positivo e negativo de rebanho para rebanho, respectivamente, de 99,07% e 81,30%, e de animais, respectivamente, de 99,07% e 57,7%.

Nos Quadros 1 e 2 são identificados os sorovares mais prevalentes, tanto os incluídos na coleção de antígenos recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) quanto os detectados por meio da utilização de uma coleção de antígenos composta de isolados de leptospiras de várias espécies animais do Brasil e depositadas na coleção da Universidade de São Paulo.

Os sorovares mais prevalentes, detectados frente a coleção recomendada pela OMS (Quadro 1), dentre os mais prováveis foram o Hardjo, com percentuais de animais reagentes variando de 5,88% (Sonora) e 63,64% (Ladário) e o sorovar Wolffi, cujos percentuais de reações detectadas variaram de 7,72% (Rio Verde) a 59,98 % (Sonora). Quando os soros foram testados frente a coleção de antígenos composta pelas estirpes autóctones, foram detectadas reações para M4/98, M9/99, LO-1, LO4, LO 14, 2CAP em diversos municípios, mas em percentuais bastante baixos. Entretanto, para o isolado obtido na região de estudo, da espécie *Cerdocyum thous*, M110/2006, somente reagiram soros provenientes de propriedades dos municípios de Corumbá e de Miranda (Quadro 2).

No Quadro 3 são demonstradas as estimativas de prevalência aparente e real de rebanhos e de animais com ajuste realizado pelas características do teste empregado e sua capacidade de classificação correta de animais (sensibilidade do teste), ou de rebanhos doentes (sensibilidade de rebanho), ou de animais ou rebanhos sadios (especificidade do teste/especificidade de rebanho), por meio da detecção individual.

Os fatores de risco identificados, de Qui Quadrado ou teste exato de Fisher, conforme o caso ($p \geq 0,2$), e subsequente estimativa do Odds Ratio, foram considerados significativos e estão agrupados no Quadro 4.

Quadro 1 - Rebanhos e animais reagentes no teste de soroprecipitação microscópica para leptospirose e suas variantes sorológicas mais prováveis, no ano de 2009, nos municípios que compõem a região do Pantanal sul-mato-grossense, utilizando a coleção de antígenos recomendada pela OMS

Municípios	Nº de reagentes			Sorovares mais prováveis (%)**									
	Rebanhos reagentes ¹	Animais reagentes ²	Mais prováveis*	Hardjo	Wolffi	Icterohaemorrhagiae	Grippotyphosa	Bratislava	Copenhageni	Canicola	Hebdomadis	Pomona	Autumnalis
Aquidauna	41	327	99	28,4	14,3	0,31	5,81	0,31	1,5	0,0	3,9	0,6	0,0
Bodoquena	27	198	66	31,8	16,1	0,0	4,55	0,0	0,0	0,0	2,0	1,0	0,0
Corumbá	25	224	27	47,3	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	0,4	0,4
Coxim	36	294	93	22,1	22,8	1,70	4,42	1,70	0,0	0,0	2,7	0,3	0,0
Ladário	6	11	1	63,6	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Miranda	25	173	38	23,7	23,7	2,31	1,73	0,0	0,6	0,0	3,4	0,0	0,6
Porto Murtinho	30	276	96	10,9	19,6	0,0	3,26	0,3	0,0	0,0	3,6	1,1	0,0
Rio Verde	40	272	92	38,9	7,7	0,74	2,57	0,3	0,0	0,0	2,2	0,3	0,0
Sonora	11	51	12	5,9	50,9	0,0	0,0	13,7	0,0	0,0	1,9	3,9	0,0
Totais	241	1826											

¹ Total de rebanhos com pelo menos um animal positivo.

² Total de animais com reação para pelo menos um sorovar.

* Número de reações aproveitadas, sendo desconsideradas aquelas com *título* mais alto idêntico para dois ou mais sorovares.

** Percentual de reações por sorovar, considerando apenas os reagentes mais prováveis.

*** nr: não reagente.

Fonte: Elaborada pelos autores

Quadro 2 - Rebanhos e animais reagentes, por município, no teste de soroglutinação microscópica para leptospirose no Pantanal de Mato Grosso do Sul e suas variantes sorológicas mais prováveis em 246 rebanhos e 2.766 animais, no ano de 2009, utilizando uma coleção de antígenos composta de estirpes de leptospiras isoladas no Brasil

Municípios	Nº de reagentes			Estirpes isoladas no Brasil mais prováveis (%)**									
	Rebanhos reagentes ²	Animais reagentes ³	Mais prováveis*	4-B (VPS) (An 776 original)	M 7-87	M 4/98	M 9/99	LO-1	LO-4	LO 14	2 A CAP	M 110/2006	
Aquidauna	41	327	99	0,0	0,0	2,4	0,3	0,3	1,5	1,2	0,6	0,0	
Bodoquena	27	198	66	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,51	0,0	0,0	0,0	
Corumbá	25	224	27	0,0	0,0	1,3	0,0	0,4	0,0	2,3	0,0	0,4	
Coxim	36	294	93	0,0	0,0	2,0	0,0	0,7	1,3	0,7	0,3	0,0	
Ladário	6	11	1	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1	0,0	9,1	0,0	0,0	
Miranda	25	173	38	0,0	0,0	2,9	0,6	0,6	0,5	0,5	0,0	1,1	
Porto Murtinho	30	276	96	0,0	0,0	0,0	0,7	1,8	5,8	1,4	0,0	0,0	
Rio Verde	40	272	92	0,0	0,0	0,3	0,7	0,3	2,2	0,7	0,3	0,0	
Sonora	11	51	12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Totais	241	1826	524										

¹ Estirpes de leptospiras isoladas de diferentes espécies animais no Brasil.

² Total de rebanhos com pelo menos um animal positivo.

³ Total de animais com reação para pelo menos um sorovar.

* Número de reações aproveitadas, sendo desconsideradas aquelas com título mais alto idêntico para dois ou mais sorovares.

** Percentual de reações por sorovar, considerando apenas os reagentes mais prováveis.

*** nr: não reagente.

Fonte: Elaborada pelos autores

Quadro 3 - Prevalência aparente e real, especificidade e sensibilidade e valores preditivos e rebanhos e animais amostrados em inquérito sorológico realizado para a leptospirose bovina em matrizes na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul em 2009

PrevApaR	PrevRR	IC	SeR	EspR	VPPR	VPNR
98%	97%	(94,9-99,2)	100%	69%	99,07%	81,30%
PrevAA	PrevRA	IC	Se	Esp	VPP	VPP
66%	79,80%	(78,3- 81,3),	82%	97%	99,07%	57,7%.

PrevApaR= Prevalência Aparente de Rebanhos

PrevRR- Prevalência Real de Rebanhos

IC= Intervalo de Confiança

PrevAA= Prevalência Aparente de Animais

PrevRA= Prevalência Real de Animais

Fonte: Elaborada pelos autores

Quadro 4 - Fatores de risco para a leptospirose nos rebanhos estudados que apresentaram $p < 0,20$ na análise univariada e seus respectivos valores de Odds Ratio (OR)

Fator de risco	Negativos	Positivos	p=	OR
Exploração				
Corte	4	150	0,04*	5,92(1,23-8,50)
Leite	3	19	0,01**	0,29(0,05-1,91)
Mista	2	43	0,625	1,74(0,31-0,85)
Tipo de propriedade				
Chácara/lote/sítio	6	56	0,0160*	5,57(1,35-3,03)
Fazenda	3	156		
Presença de equinos				
Sim	4	185	0,039*	8,56(2,16-3,89)
Não	5	27		
Presença de ovinos e caprinos				
Sim	7	107	0,17	0,29(0,06-1,43)
Não	2	105		
No. de fêmeas em reprodução				
≤ 100	8	119	0,0820	0,16(0,02-1,30)
≥ 100	1	93		
Raças				
Zebu	3	156	0,0160*	5,57(1,35-3,03)
Mestiço/Europeu/outras	6	56		

*Teste exato de Fisher

Fonte: Elaborada pelos autores

DISCUSSÃO

Nos nove municípios que compõem a região do Pantanal sul mato-grossense, foram detectados rebanhos e animais sororreagentes para leptospirose bovina. A prevalência aparente de rebanhos foi de 98%, com 241 dos 246 rebanhos testados apresentando pelo menos um animal positivo no teste de SAM. A prevalência real de rebanhos, ajustada para a SenR (100%) e EspR (69,4%), foi de 97%. A prevalência aparente de animais foi de 66%, sendo também ajustada considerando-se uma sensibilidade e especificidade individual da SAM respectivamente de 82% e 97%, estimando a prevalência real de animais infectados em 79,80% com IC de 95% (78,3- 81,3).

Resultado semelhante foi observado por Favero et al. (2001) no estado de Mato Grosso do Sul, onde 100% dos municípios apresentaram pelo menos um animal sororreagente em todos os rebanhos amostrados. Fontana (2011), estudando a relação epidemiológica existente entre duas populações simpátricas de mamíferos no Pantanal do Mato Grosso do Sul, bovinos e porcos-monteiros, amostrou 12 propriedades e testou 266 amostras, encontrando um percentual de soropositividade para a leptospirose de 76,69% (204), com maior ocorrência de reações para os sorovares Hardjo, Tarassovi e Grippytyphosa. A prevalência dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Pomona nos bovinos foi, entretanto, de apenas 3,75% e 3%, respectivamente, embora nos suínos ferais estes tenham sido os sorovares mais frequentes.

A prevalência de leptospirose bovina nos rebanhos amostrados no presente inquérito foi a mesma encontrada em outros inquéritos transversais com desenho amostral similar, como os conduzidos por Aguiar et al. (2006), no município de Monte Negro, Rondônia, de 95,3% (IC, 95%: 88,5 – 98,7%) por Homem et al. (2000) no município de Uruará, Pará, que estimou prevalência de rebanho também elevada, de 97% (IC 95%: 90,9 – 99,5%). Oliveira (2010), no Estado da Bahia, também realizou estimativas de prevalências de rebanho e individual, que ficaram em 77,93% e 45,42%, respectivamente, com base em uma amostragem probabilística de diferentes regiões do estado, indicando haver diferença significativa entre as prevalências observadas nos diferentes circuitos pecuários amostrados.

O inquérito realizado por Figueiredo em 2007 em outro estrato do Mato Grosso do Sul, composto de 22 municípios, demonstrou a presença de fêmeas em reprodução sororreagentes em 85% dos rebanhos (161) e 98,8% dos animais (1.801). Os ICs (95%) para a prevalência aparente e real de rebanhos foi de 90,4% (IC 95%: 95,1%-85,8%) e 85,2% (IC 95%: 80,1% -90,2%). A prevalência de animais foi de 81,1%, sendo os sorovares mais

prevalentes o Hardjo (65,6%), seguido do sorovar Wolffi (12,3%), semelhante ao encontrado no presente estudo. Deve-se ressaltar que, no trabalho realizado por Figueiredo (2007), o ponto de corte utilizado para classificar um rebanho como positivo foi o achado de quatro animais reagentes frente ao teste SAM, enquanto que, no presente estudo, foi de apenas um animal. Assim, como os inquéritos acima citados, o presente trabalho é o primeiro desenhado com o objetivo de estimar a prevalência da leptospirose em fêmeas em reprodução no Pantanal, destacando-se sua importância pelo fato de essa região ser eminentemente de cria, tendo no bezerro desmamado seu principal produto. Dessa forma, investigações que permitam inferências sobre possíveis causas de perdas reprodutivas podem ter uma aplicação no estabelecimento de um calendário sanitário profilático que otimize a fertilidade do rebanho.

Oliveira (2010) avaliou 1.414 propriedades e 10.823 soros de fêmeas em idade reprodutiva de rebanhos bovinos do estado da Bahia, estimando as prevalências de rebanho e individual em 77,93% e 45,42%, respectivamente, indicando uma diferença significativa entre as prevalências observadas nos diferentes circuitos pecuários amostrados. Nesse trabalho, foi evidenciada a predominância de reações para os sorovares Hardjo (Hardjoprajitno) em 34,39% dos rebanhos, e fatores de risco, tais como compra de reprodutores, presença de suínos e de cervídeos na propriedade, áreas alagadiças, aluguel de pasto e raças especializadas.

A utilização de estirpes autóctones, tanto para uso como antígenos no diagnóstico sorológico quanto na produção de vacinas, é uma forma de aumentar a acurácia do teste de SAM, minimizando a ocorrência de animais falsos negativos e falsos positivos, metodologia que tem sido utilizada por alguns autores, tanto no diagnóstico de leptospirose em bovinos (SARMENTO et al., 2002) quanto em animais silvestres (VIEIRA et al., 2011, 2013). Na soroaglutinação microscópica para leptospirose, a coleção de estirpes empregadas como antígenos, idade e densidade dos cultivos, diluição final dos soros, temperatura e tempo de incubação, são fatores que influenciam diretamente na obtenção dos resultados (NOORDHUIZEN et al., 1997; SARMENTO et al., 2012). O presente estudo utilizou, além da coleção de antígenos recomendada pela OMS, uma coleção complementar de isolados autóctones. Um dos antígenos empregados na coleção de sorovares autóctones foi isolado de um *Cerdocyus thous* capturado na mesma região onde foi realizado o presente trabalho. O uso da coleção de isolados autóctones não pareceu agregar maior sensibilidade à detecção dos animais sorologicamente positivos, apesar de Sarmiento et al. (2012) detectarem uma elevação em 6% de reações encontradas para a leptospira quando a coleção de antígenos convencionalmente empregada era ampliada com a agregação dos sorovares autóctones,

posicionando o sorovar Guaricura como o mais reagente nos soros testados provenientes do Estado de Mato Grosso do Sul, seguidos pelos sorovares Hardjo e Shermani. Nesse trabalho, os sorovares Hardjo e Wolffi foram os mais prevalentes, sugerindo que a leptospira mantém-se na população bovina de forma autossustentável, pois nem mesmo o antígeno autóctone (M110/2006) isolado em animal silvestre na própria região de estudo foi detectado de forma significativa na população. O sorovar Hardjo já foi isolado de bovinos no Brasil, sendo também tipificado por Moreira (1994). Apesar disso, não há registros no Brasil de isolamento do sorovar Wolffi a partir de bovinos, já tendo havido isolamentos de roedores silvestres (*Akodon arviculoides*) (CORREA et al., 1965, 1967 apud SARMENTO, 2012), camundongos (*Mus musculus*) (GIORGI et al., 1984), e mesmo do homem (CORREIA et al., 1965). A manutenção da doença dentro da própria população bovina também pode ser concluída pelos resultados apresentados por Fontana (2011), que demonstrou que os sorovares mais frequentes em bovinos são registrados em baixíssimos níveis em suínos ferais, mesmo vivendo em simpatia. No trabalho realizado pela autora, em parte da mesma área de estudo no Pantanal do Mato Grosso do Sul, foram detectados níveis de positividade de 47,74% para o sorovar Hardjo em bovinos, e somente 0,66% para suínos ferais, enquanto que, nessa última população, os sorovares mais frequentes foram a Icterohaemorrhagiae (44,37%) e Pomona (19,2%), sorovar esse também encontrado com maior frequência em veados campeiros por Vieira (2011).

Os sorovares Hardjo e Wolffi têm sido encontrados como os mais prevalentes em bovinos em inúmeros trabalhos, como os realizados por Favero et al. (2001), que abrangeu 21 estados do Brasil; por Lilenbaum e Souza (2003), no Rio de Janeiro, com frequências de animais reagentes de 43,8% para o sorovar Hardjo e 24,7% para o Wolffi e, na mesma área de estudo, por Pellegrin et al., em 1999, tanto em animais quanto em rebanhos.

Trabalho com desenho experimental semelhante, mas com abrangência para todo o Estado de São Paulo, foi realizado por Castro et al., em 2008, permitindo uma estimativa da prevalência de leptospirose, tanto em rebanhos quanto em animais, identificando os sorovares Hardjo (46%) e Wolffi (21%) associados como os de maior frequência, seguidos pelos sorovares Shermani (8,9%), Autumnalis (4,4%) e Grippytyphosa (3,9%).

No presente trabalho, o levantamento de fatores de risco associados à leptospirose foi principalmente ao tipo de propriedade (OR 5,57 [1,35-3,03]; p= 0,0160), à raça zebuína (OR 5,57 [1,35-3,03]; p= 0,0160) e ao tipo de exploração de corte (OR 5,92 [1,23-8,50]; p=0,04), embora fatores aparentemente significativos, como presença de equinos (OR 8,56 (2,16-3,89; p= 0,039) possam também ser associados ao tamanho de rebanho e tipo de exploração, dado

que, em propriedades de maiores dimensões, o manejo do rebanho depende do cavalo de montaria e nelas são mantidos grandes rebanhos equinos. Figueiredo et al. (2009) encontrou associação positiva entre tipo de criação e raça e a presença de anticorpos para a leptospirose, indicando que a doença tem maior risco de ocorrer em grandes rebanhos. As mesmas conclusões foram considerados por Castro et al. (2008). Esses autores também apontaram uma distribuição da doença em todo o estado, sem significativa associação aos fatores de risco, evidenciando que o sorovar Hardjo está amplamente distribuído no Estado de São Paulo, sem relação com o tipo de exploração, manejo e práticas de reprodução adotadas nos rebanhos. Outras variáveis estudadas, como a presença de áreas alagadiças na propriedade, presença de animais silvestres, assistência veterinária, presença de suínos, caprinos ou ovinos, bem como disponibilidade, ou não, de assistência veterinária, também não demonstraram nenhuma associação com a prevalência da doença, provavelmente porque o levantamento realizado por meio do questionário para essas variáveis teve uma abordagem qualitativa e foi realizado em uma época considerada seca, quando tanto a precipitação pluviométrica quanto a distribuição espacial de áreas alagadiças é reduzida.

A leptospirose bovina encontra-se presente em todos os municípios estudados, observando-se alta prevalência, tanto em animais como em rebanhos, com pelo menos um animal reagente à prova sorológica. Apesar de os sorovares Hardjo e Wolffi serem os mais prevalentes neste estudo, não são os únicos a circularem na população bovina da região, devendo isto ser considerado para aplicação de práticas de profilaxia e controle da doença.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. p. 112-119.

AGUIAR, D. M. et al. Seroprevalence of *Leptospira spp.* in cattle from Monte Negro municipality, Western Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 102-104, 2006.

ALONSO-ANDICOBERRY, C. et al. Herd-level risk factors associated with *Leptospira spp.* Seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 52, p. 109-117, 2001.

ARAÚJO, V. E. M. et al. Frequência de aglutininas anti-leptospira interrogans em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005.

ARMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F. Bovine Leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, v. 43, p. 875-891, 1975.

BLAHA, T. **Epidemiología especial veterinaria**. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 128-136.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Leptospirose**. 2. ed. rev. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. IBGE. Resolução n.º 5, de 10 de outubro de 2002, que dispõe sobre a Área Territorial. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 198, p. 48-65, 11 out. 2003.

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

CERVANTES, L. P. M. et al. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. **Revista Cubana de Medicina Tropical y Parasitología**, v. 54, n. 1, p. 24-27, 2002.

COLE JUNIOR, J. R.; SULZER, C. R.; PURSELL, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination Test. **Journal of Applied Microbiology**, v. 25, p. 970-980, 1973.

CORREA, M. O. A., et al. Estudos sobre a *Leptospira wolffi*, em São Paulo., **Revista instituto Adolfo Lutz**, v. 25/27, p.11-25, 1965/1967.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O. R.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 731-734, 1999.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary epidemiologic research**. 2. ed. Prince Edward Island: University of Prince Edward Island, 2010.

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

FAINE, S. **Guidelines for the control of Leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982.

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci, 1999.

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

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

FONTANA, I. Avaliação do porco monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do Pantanal Sul-Mato-Grossense. 2011. 62f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de Brasília, Brasília, DF.

GALTON, M. M. et al. Application of a microtechnique to the Agglutination Test for Leptospiral Antibodies. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 81-85, 1965.

GARCIA, E. A.; CASTRO, L. H. R. Análise da frequência de chuva no Pantanal Mato-Grossense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 9, p. 909-925, 1986.

GIRIO, R. J. S.; LEMOS, R. A. A. Enfermidades da reprodução: Leptospirose. In: LEMOS, R. A. A.; BARROS, N.; BRUM, K. B. (Orgs.). **Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: perguntas e respostas**. Campo Grande: UFMS, 2002. p. 253-260.

GIRIO, R. J. S. et al. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* em animais silvestres em estado feral da região da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para a detecção do agente. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 165-169, 2003.

GIORGI, W. et al. Leptospirose: resultados das soroaglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo durante os anos de 1974/1980. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, p. 299-309, 1981.

GIORGI, W. et al. *Leptospira interrogans* sorotipo *wolffi* isolada de camundongo capturado no Porto de Santos, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 50, n. 12, p. 295-297, 1984.

GUIMARÃES, M. C. et al. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos: papel do portador e seu controle terapêutico. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 7, n. 4, p. 21-34, 1983.

HOMEM, V. S. F. et al. Leptospirose bovina em Uruará, PA, município da Amazônia Oriental. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 1-8, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2003**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. v. 31.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2004**. Rio de Janeiro: IBGE, 2005. v. 32.

JULIANO, R. S. et al. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 857-862, 2000.

LANGONI, H. et al. Perfil sorológico da Leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 37-41, 2000.

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

LILENBAUM, W. ; SANTOS, M. R. C. Leptospirosis in animal reproduction: III. Role of the hardjo serovar in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, v. 37, n. 2, p. 87-92, 1995.

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

LINS Z. C.; LOPEZ, M. L.; MAROJA, O. M. Bacteriologia: epidemiologia das leptospiroses com particular referência à Amazônia brasileira. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição a ciências biológicas e a medicina tropical**. Belém: Ministério da Saúde, 1986. p. 733-764.

MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; WILLEBERG, P. **Veterinary epidemiology: principles and methods**. Ames: Iowa State University, 1987.

MARTIN, S. W.; SHOUKRI, M.; THORBURN, M. A. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, p. 33-43, 1992.

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

MEDRONHO, R. A. et al. **Epidemiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

MILLER, D. A.; WILSON, M. A.; BERAN, G. W. Relationships between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic, and seasonal factors. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 11, p. 1766-1768, 1991.

MONTEIRO, L. A. R. C. **Prevalência e fatores de risco associados à brucelose bovina em rebanhos de Mato Grosso do Sul**. 2004. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

MONTEIRO, L. A. R. C. et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2006.

MOREIRA, E. C. Avaliação de métodos para erradicação de Leptospirose de bovinos leiteiros. 1994. 94p. Tese (Doutorado em Veterinária) - Escola De Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M. et al. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology**. Wageningen: Wageningen, 1997.

OIE. World Organization for Animal Health. **Leptospirosis**. 2006. [Chapter 2.2.4]. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm>. Acesso em: 6 jan. 2006.

OLIVEIRA, A. A. F. et al. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns municipal district, Pernambuco State, Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 275-279, 2001.

OLIVEIRA, R. C. **Utilização de estirpe local de *leptospira spp* na prova de soroaglutinação microscópica para a leptospirose canina**. 2003. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

OLIVEIRA, F. C. S. et al. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398-402, 2010.

PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B. Leptospirose e sua relação com fertilidade em um grupo de matrizes neloradas no Pantanal, sub-região da Nhecolândia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23. 1994, Olinda. **Anais...** Recife: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1994.

PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; FIGUEIREDO, J. O. Levantamento sorológico de aglutininas anti-leptospira em bovinos da sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul-matogrossense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1992, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Sociedade Paranaense de Medicina Veterinária, 1992.

PELLEGRIN, A. O. et al. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. **Embrapa Pantanal: comunicado técnico**, n. 22. p. 1-9, nov. 1999.

PRESCOTT, J. F. et al. Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 210-215, 1988.

RAMOS, A. C. F.; LILENBAUM, W. Factors influencing the occurrence of anti-Leptospira antibodies in pigs from Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 78-81, 2002.

SALLES, R. S.; LINLENBAUM, W. Leptospirose bovina no Brasil. **Revista CFMV**, mai.-ago. 2000. [Suplemento técnico nº 20].

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998.

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

SILVA, F. J. et al. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 303-312, 2012.

VASCONCELLOS, S. A. et al. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipo predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, p. 7-15, 1997.

VIEIRA, A. S. et al. Survey of *Leptospira spp* in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Pantanal wetlands of the state of Mato Grosso do Sul, Brazil by serology and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 763-768, 2011.

VIEIRA, A. S. et al. Identificação de mamíferos silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense portadores de *Leptospira spp*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 373-380, 2013.

ANEXO I

Questionário aplicado nas propriedades rurais

01-Identificação:		02 – Data da visita e colheita: ____/____/____	
Município: _____	UF: _____	03 – Código do rebanho no estudo (8 dígitos) ____.____.____.____.____.____.____.____.	
Proprietário: _____	_____		
Propriedade: _____	_____		
Código de cadastro no serviço de defesa: _____		04 – Coordenadas Lat: ____° ____' ____" Lon ____° ____' ____"	

05- Tipo da Exploração: <input type="checkbox"/> corte <input type="checkbox"/> leite <input type="checkbox"/> mista
06- Tipo de Criação: <input type="checkbox"/> confinado <input type="checkbox"/> semiconfinado <input type="checkbox"/> extensivo
07- Nº de ordenhas por dia: <input type="checkbox"/> 1 ordenha <input type="checkbox"/> 2 ou 3 ordenhas <input type="checkbox"/> Não ordenha
08- Tipo de ordenha: <input type="checkbox"/> manual <input type="checkbox"/> mecânica ao pé <input type="checkbox"/> mecânica em sala de ordenha <input type="checkbox"/> Não ordenha
09- Produção de leite: a) Nº de vacas em lactação: _____ b) Produção diária de leite na fazenda: _____ litros
10- Usa inseminação artificial? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> usa inseminação artificial e touro <input type="checkbox"/> usa só inseminação artificial
11- Raça predominante - Bovinos: <input type="checkbox"/> zebu <input type="checkbox"/> europeu de leite <input type="checkbox"/> europeu de corte <input type="checkbox"/> mestiço <input type="checkbox"/> outras raças - Bubalinos: <input type="checkbox"/> murrh <input type="checkbox"/> mediterrâneo <input type="checkbox"/> carabao <input type="checkbox"/> jaffarabadi <input type="checkbox"/> outras raças

12(a)- Bovinos existentes									12(b)- Bubalinos existentes								
Machos Castrados	Machos inteiros				Fêmeas				Machos Castrados	Machos inteiros				Fêmeas			
	(meses)				(meses)					(meses)				(meses)			
Total	0- 6	6- 12	12- 24	> 24	0- 6	6- 12	12- 24	> 24	Total	0- 6	6- 12	12- 24	> 24	0- 6	6- 12	12- 24	> 24

13- Outras espécies na propriedade: ovinos/caprinos equídeos suínos aves cão gato

14- Espécies silvestres em vida livre na propriedade: não tem cervídeos capivaras outras:.....

15- Alguma vaca/búfala abortou nos últimos 12 meses? não sim não sabe

16- O que faz com o feto abortado e a placenta? enterra/joga em fossa/queima alimenta porco/cão não faz nada

17- Faz testes para diagnóstico de brucelose? não sim

Regularidade dos testes: uma vez ao ano duas vezes ao ano quando compra animais quando há casos de aborto na fazenda quando exigido para trânsito/eventos/crédito

18- Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução? não sim

Onde/de quem: em exposição em leilão/feira de comerciante de gado diretamente de outras fazendas

19- Vende fêmeas ou machos para reprodução? não sim

A quem/onde: em exposição em leilão/feira a comerciante de gado diretamente a outras fazendas

20- Vacina contra brucelose? não sim, apenas fêmeas até 8 meses de idade sim, fêmeas de qualquer idade

21- Local de abate das fêmeas e machos adultos no fim da vida reprodutiva: na própria fazenda em estabelecimento sem inspeção veterinária em estabelecimento de abate com inspeção veterinária não abate

22- Aluga pastos em alguma época do ano? não sim

23- Tem pastos em comum com outras propriedades? não sim

24- Existem na propriedade áreas alagadiças às quais o gado tem acesso? não sim

25- Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto? não sim

26- A quem entrega leite? cooperativa laticínio direto ao consumidor não entrega

27- Resfriamento do leite: não faz faz

Como: em resfriador ou tanque de expansão próprio em resfriador ou tanque de expansão coletivo

28- A entrega do leite é feita a granel? não sim

29- Produz queijo e/ou manteiga na propriedade? não sim Finalidade: p/ consumo próprio p/ venda

30- Consome leite cru? não sim

31- Tem assistência veterinária? não sim

De que tipo? veterinário da cooperativa veterinário particular

32- Compartilha aguadas\bebedouros com animais de outra(s) propriedade(s)? não sim

NOME DO VETERINÁRIO _____

ASSINATURA _____