

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Aline de Oliveira Figueiredo

**LEPTOSPIROSE BOVINA: PREVALÊNCIA, VARIÁVEIS
DE RISCO E SOROVARES PREDOMINANTES EM
REBANHOS DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

**BOVINE LEPTOSPIROSIS: PREVALENCE, RISK
VARIABLES, AND PREDOMINANT SEROVARS IN
HERDS IN MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Leptospirose da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal - IAGRO -, em Campo Grande, MS - Brasil

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
MARÇO – 2007**

ALINE DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

**LEPTOSPIROSE BOVINA: PREVALÊNCIA, VARIÁVEIS DE RISCO E
SOROVARES PREDOMINANTES EM REBANHOS DE MATO GROSSO
DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL

2007

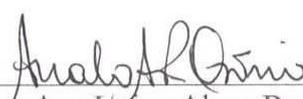
ALINE DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

LEPTOSPIROSE BOVINA: PREVALÊNCIA, VARIÁVEIS DE RISCO E SOROVARES PREDOMINANTES EM REBANHOS DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área concentração: Saúde Animal.

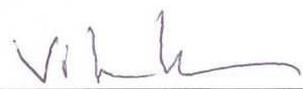
APROVADA: 28/03/2007



Dra. Ana Luíza Alves Rosa Osório
Orientadora



Dra. Aiesca de Oliveira Pellegrin



Dr. Vitor Salvador Picão Gonçalves

*"A Deus,
Que de uma forma muito especial vem
agindo em minha vida, guiando-me por
caminhos que me levam a alcançar meus
objetivos. A Ele ofereço mais esta
conquista".*

*"À minha família,
que é o alicerce da minha vida e que
sempre me incentivou a buscar
o conhecimento."*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a construir esta dissertação, em especial:

Minha família e amigos, por partilharem de momentos de alegria e segurança, e pela paciência nos momentos de irritação e ansiedade;

Ana Luiza Alves Rosa Osório por ser, mais que uma orientadora, uma amiga; agradeço pela atenção, disposição e por todas as horas dedicadas a me ajudar;

Emanuel Barbosa de Freitas, que se tornou meu amigo e que me ensinou não só sobre leptospirosas, mas também sobre algumas facetas da vida;

Jacqueline Marques de Oliveira, pela amizade, incentivo e por ser sempre muito prestativa e disposta a me ajudar;

Letícia Almeida Retumba Carneiro Monteiro, pelos materiais e soros cedidos, os quais sem eles nada disso seria possível. Agradeço também pela atenção, amizade e disposição em me ajudar;

Aiesca Oliveira Pellegrin pelas sugestões e ajuda na construção do artigo;

Aos membros da banca de qualificação pelas contribuições;

Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal - IAGRO, por permitir a realização dos exames no Laboratório de Leptospirose. Neste caso agradeço também a Veronique Micheline Claude Louvet Cortada, gestora do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais - LADDAN/IAGRO durante a realização dos exames.

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
BSA	Albumina Sérica Bovina
ELISA	Enzime-linked immunoassay
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
Esp	Especificidade do teste
EspR	Especificidade de rebanho
FNT	Fator de Necrose Tumoral
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
INF-γ	Interferon-γ
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OR	<i>Odds ratio</i> (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
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

RESUMO

Figueiredo A. O. Leptospirose bovina: prevalência, variáveis de risco e sorovares predominantes em rebanhos de Mato Grosso do Sul, Brasil. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Foi investigada a prevalência de anticorpos antileptospira em fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de 178 rebanhos de 22 municípios do Estado de Mato Grosso do Sul. Foram analisadas 2.573 amostras de soro sanguíneo por meio do teste de soroaglutinação microscópica perante 10 sorovares de leptospira. Títulos iguais ou superiores a 100 para um ou mais sorovares foram detectados em 1.801 fêmeas (98,8%) de 161 (85,2%) rebanhos. O sorovar hardjo (65,6%) foi apontado como o mais provável, seguido do sorovar wolffi (12,3%). Os resultados demonstram que a leptospirose bovina se encontra presente em todos os municípios estudados, com alta prevalência, tanto em animais como em rebanhos. No caso particular deste estudo, os fatores de risco significantes para infecção dos rebanhos por leptospirosas foram o tipo de exploração pecuária de corte e a raça Zebu.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leptospirose, bovinos, epidemiologia, rebanho

ABSTRACT

Figueiredo A. O. Bovine leptospirosis: prevalence, risk variables, and predominant serovars in herds in Mato Grosso do Sul, Brazil. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

The prevalence of anti-*Leptospira* sp. antibodies was investigated in female cattle aged 24 months and older from 178 herds in 22 counties in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. A total of 2,573 blood serum samples were tested against 10 leptospira serovars using the microagglutination test (MAT). Titers of 100 or higher for one or more serovars were detected in 1,801 females (98.8%) from 161 herds (85.2%). Serovar *hardjo* (65.6%) was implicated as the most likely one, followed by serovar *wolffi* (12.3%). The results demonstrate the presence of bovine leptospirosis in all the counties investigated, with a high prevalence both among animals and herds. In this particular investigation, beef-cattle raising and the Zebu breed were the risk factors found to be significant for herd infection by leptospiras.

INDEXING TERMS: Leptospirosis, bovines, epidemiology, herd

LISTA DE FIGURA E TABELAS

- Tabela 1- Especificidade e sensibilidade de rebanhos com tamanho médio de 300 animais considerando como ponto de corte 4 (quatro) animais positivos (assumindo uma distribuição hipergeométrica: cálculos realizados com assistência do software Herdacc®)..... 58
- Tabela 2 - Frequência de leptospirose bovina, em rebanhos e animais, obtida por meio do teste de soroaglutinação microscópica. 63
- Figura 1- Percentual de amostras reagentes, segundo os sorovares mais prováveis, analisadas por meio do teste de soroaglutinação microscópica. n=1.380 (total de reações mais prováveis) 64
- Tabela 3- Prevalência aparente, intervalo de confiança, sensibilidade e especificidade de rebanho, prevalência real e valores preditivos de leptospirose bovina em rebanhos. 65
- Tabela 4 – Prevalência aparente simples, ponderada, intervalo de confiança e prevalência real de leptospirose bovina em animais..... 65
- Tabela 5 – Variáveis de risco para leptospirose nos rebanhos considerando as reações para pelo menos um sorovar, com os correspondentes valores de odds ratio (OR). 66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 HISTÓRICO.....	12
1.2 ETIOLOGIA.....	15
1.3 PATOGENIA.....	18
1.4 IMUNIDADE.....	20
1.5 SINAIS CLÍNICOS.....	22
1.6 DIAGNÓSTICO.....	25
1.6.1 Considerações teóricas sobre estimativas de prevalência e de variáveis de risco.....	29
1.7 EPIDEMIOLOGIA.....	32
1.7.1 Fatores de risco ligados ao animal.....	35
1.7.2 Fatores de risco relacionado ao ambiente e ao manejo.....	36
1.7.3 Implicações econômicas.....	37
1.7.4 Implicações zoonóticas.....	38
1.7.5 Leptospirose bovina no Brasil.....	38
1.8 CONTROLE.....	40
REFERÊNCIAS.....	45
ARTIGO.....	53
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	63
DISCUSSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE A.....	76
APÊNDICE B.....	77

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença contagiosa que acomete animais e humanos, causada pela infecção por qualquer espécie patogênica de bactérias do gênero *Leptospira* (OIE 2006). É uma antropozoonose direta, que tem como hospedeiros primários os animais selvagens, sinantrópicos e domésticos. Os seres humanos comportam-se como hospedeiros terminais, acidentais. A sua distribuição geográfica é cosmopolita, no entanto, na América Latina, África e Ásia, os níveis de ocorrência são elevados pois as condições ambientais favorecem a persistência e a disseminação da infecção (Blenden 1976).

Em termos de saúde pública tem impacto por ser uma zoonose e pelo alto custo do tratamento dos seres humanos. Na saúde animal, as conseqüências dessa infecção são de esfera econômica, tendo em vista o envolvimento de animais de produção como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e eqüinos (Brasil 1995).

O gênero *Leptospira* compreende bactérias de morfologia similar, mas que em testes de soroaglutinação são antigenicamente distintas, sendo assim classificadas em diferentes sorovares. Cada sorovar tem um hospedeiro natural que atua como reservatório do agente (Girio & Lemos 2002).

O diagnóstico da enfermidade compreende a pesquisa de anticorpos específicos e a pesquisa direta do microrganismo a partir do sangue, urina, líquido e em determinadas circunstâncias de outros materiais biológicos. Porém, considerando as dificuldades para o isolamento do agente, os métodos indiretos são os mais empregados, dentre eles a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) (Brasil 1995).

O contágio ocorre a partir de pequenos mamíferos de vida selvagem, sendo transmitida por meio de águas paradas contaminadas com urina infectada desses animais, ou por meio da monta natural (Sleight & Willian's 1961, Blaha 1995).

As principais manifestações da leptospirose nos bovinos são transtornos reprodutivos como infertilidade, aborto, nascimento de bezerros fracos e diminuição temporária da produção leiteira (Cervantes et al. 2002).

1.1 HISTÓRICO

A primeira demonstração da bactéria *Leptospira* spp foi feita por Stimson no ano de 1907, fato importante para a história da nomenclatura do agente etiológico. Stimson corou tecido renal de um paciente descrito como falecido de “febre amarela” e esse tecido continha organismos espiralados com ganchos nas extremidades, os quais ele denominou “*Spirochoeta interrogans*”. Depois disso, muitos pesquisadores passaram a reproduzir a doença em cobaias e outras denominações para o microrganismo foram dadas (Faine et al. 1999).

A descoberta dos ratos, como portadores da doença, abriu caminho para o entendimento dos princípios epidemiológicos de transmissão por portadores animais e para controle da doença, tão bem como para futuras pesquisas de outros reservatórios animais de leptospirose (Faine et al. 1999).

Com o passar do tempo, leptospiras foram isoladas de pacientes com um número de síndromes as quais poderiam ser reconhecidas como diferentes formas de leptospirose. Diferenças sorológicas foram descobertas entre leptospiras de doenças aparentemente similares; as estirpes que foram isoladas falharam em teste sorológico de absorção cruzada e não tiveram proteção cruzada em infecções experimentais. Muitas das estirpes eram de origem diferente, algumas de um único reservatório animal (Faine et al. 1999).

Um grande número de estirpes foi diferenciado levando-se em conta a epidemiologia, o padrão da doença e uma limitada série de características fenotípicas (morfologia similar). Por causa desta limitada diferença fenotípica, utilizou-se como base para identificação e classificação as diferenças

antigênicas, quanto ao antígeno aglutinante (Lipopolissacarídeo – LPS), tornando-se o sorovar a base taxonômica. Duas estirpes pertencem ao mesmo sorovar se menos de 10% dos anticorpos homólogos permanecerem em ambos os soros após a absorção. E pertencentes a sorovares diferentes quando 10% ou mais dos anticorpos homólogos persistirem em pelo menos um dos dois anti-soros após a absorção. Por possuírem semelhanças sorológicas, porém com diferenças antigênicas individuais, os sorovares, por sua vez, foram agrupados em sorogrupos, sendo que esta classificação não tem uma posição taxonômica (Adler & Faine 2005).

A leptospirose passou a ser reconhecida como um problema de saúde animal e de saúde pública no final da década de 1930 (Faine et al. 1999). A partir de então, passou a ser identificada como uma doença ocupacional, tendo como fator comum a exposição direta a tecidos ou urina de animais contendo leptospiras (Heath & Johnson 1994, Faine et al. 1999).

Uma lista de sorovares foi publicada internacionalmente no ano de 1939, e a partir daí, muitos outros sorovares foram relatados. Uma vez que uma série de sorovares foi reconhecida, ficou claro que reações cruzadas ocorreriam e que isso complicaria o diagnóstico, pois as reações podem não ser específicas para um dado sorovar (Faine et al. 1999).

Têm-se reconhecido cerca de 288 sorovares nomeados em 30 sorogrupos (Brenner et al. 1999), conforme Tabela 1, sendo que aproximadamente 230 entre leptospiras patogênicas e um menor número entre as leptospiras saprófitas (Faine et al. 1999), sendo indistinguíveis morfológicamente (Faine 1982).

Tabela 1 – Número de sorovares pertencentes a cada sorogrupo de *Leptospira interrogans* e alguns de seus representantes.

Sorogrupo	Número de sorovares	Sorovares
Andamana	1	andamana
Australis	15	australis, bangkok, barbudensis, bratislava, fugis, hawain, jalna, lora, muenchen, nicarágua, peruviana, pina, ramisi, rushan, wewak
Autumnalis	16	alice, autumnalis, bangkinang, bim, bulgarica, butembo, carlos, djasiman, erinaceauriti, fortbragg, lambwe, mooris, rachmati, srebarna, weerasinghe,
Ballum	7	arbórea, ballum, castellonis, guangdong (ballum 3), kenya, soccoestomes
Bataviae	15	argentiniensis, balboa, bataviae, brasiliensis, claytoni, djatzi, habaki, kobbe, losbanos, moldaviae, paidjan, rioja, 21-74, 26-73
Canicola	16	bafani, benjamini, bindjei, broomi, canicola, dukou, galtoni, jonsis, kamituga, kuwait, malaya, portlandvere, qunjian, schueffneri, sumneri
Celledoni	5	anhua, celledoni, hainan, mengdeng, whitcombi
Codice	1	código
Cynopteri	3	cynopteri, naparuca, tingomariensis
Djasiman	4	agogô, gurungi, huallaga, sentot
Grippotyphosa	11	canalzonae, grippotyphosa, liangguang, ratnapura, valbuzzi,
Hebdomadis	23	abrahamson, borincana, figeiro, goiano, hebdomadis, istrica, jules, kabura, kambale, kremastos, longnan, manzhuang, maru, nanding, nona, worsfoldi, 87- 029496
Holand	1	holland
Icterohaemorrhagiae	26	birkini, bogvere, budapest, copenhageni, dakota, gem, honghe, hualin, icterohaemorrhagiae, lai, mankarso, monymusk, mwogolo, naam, nanxi, ndahambukuje, ndambari, smithi, tonkini, 82224
Javanica	19	ceylonica, coxi, dehong, fluminense, harbola, javanica, may, mengla, mengma, menoni, menrun, poi, sofia, sorexjalna, vargonicas, yaan, zhenkang, 27-75, 52-73
Leptonema	1	illini
Louisiana	3	lanka, louisiana, orleans
Lyme	1	lyme
Manhao	5	lichuan (manhao 4), lincang, lushui (manhao 1), manhao 3, qingshui (manhao 2)
Mini	10	beye, geórgia, hekou, mini, perameles, rugarupae, szwajizak, tabaquite, yunnan
Panama	3	crisobali, mangus, panama
Pomona	15	cornelli, dania, kennewicki, kunming, monjakov, mozdok, pomona, proechimys, tropica, tsaratsovo, tunis
Pyrogenes	20	abramis, alexi, bagua, biggis, camlo, cenepa, guaratuba, hamptoni, kwale, manilae, menglian, myocastoris, princeton, pyrogenes, robinsoni, sanmartini, varela, zanoni
Ranarum	3	evansi, pingchang, ranarum
Sarmin	5	machiguenga, rio, sarmin, waskurin, weaveri
Sejroe	27	balcânica, caribe, dikkeni, geyaweera, gorgas, guaricura, haemolytica, hardjo, jin, medanensis, nero, nyanza, polonica, recreo, ricardi, roumanica, saxkoebing, sejroe, trinidad, unipertama, wolffi, x 47
Semaranga	3	patoc, saopaulo, semaranga
Shermani	5	aguaruna, babudieri, carimagua, luis, shermani
Tarassovi	24	aguatia, atchafalaya, atlantae, bac 1376, bakeri, bravo, chagres, darien, gatuni, gengma, guidae, kanana, kaup, kisuba, langati, mogdeni, navet, rama, sulzeriae, tarassovi, vughia, yunxian, 83 - 011457
Turneria	1	parva
Undesignated (Não Designado)	15	agc, bajan, bananal, biflexa, gent, peru, ranarum shu, sichuan, undesignated, undesignated, wawain, k 128, k 142, 83-015437, 84 - 011370

Fonte: Adaptado de Brenner et al. 1999.

1.2 ETIOLOGIA

O gênero *Leptospira* compreende bactérias espiraladas, delgadas de 0,1 a 0,2 μm de largura por 6 a 20 μm de comprimento (Fig. 1), pertencentes à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, caracterizadas por apresentarem motilidade ativa e movimentos rotacionais. Usualmente uma ou ambas as extremidades da célula apresentam ganchos, porém formas sem ganchos podem ocorrer, as quais se movimentam mais lentamente (Faine 1982).

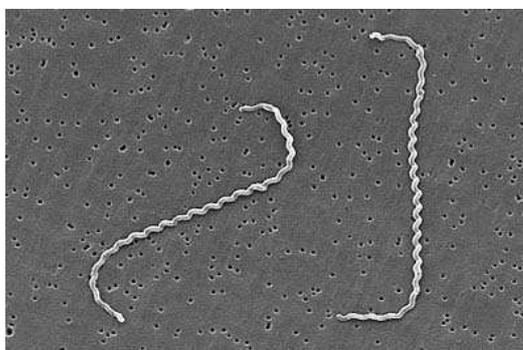


Figura 1 - Micrografia eletrônica de *Leptospira interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* (Weyant et al. 1999).

A arquitetura de membrana celular das espiroquetas apresenta característica de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Como nas gram-positivas, as bactérias apresentam a membrana citoplasmática da célula associada com o peptidoglicano da parede celular (Haake 2000). Apresentam também, uma membrana externa que envolve os filamentos axiais e o cilindro protoplasmático, separada virtualmente do cilindro protoplasmático, pelo espaço periplasmático (Fig. 2), assemelhando-se, exceto por envolver os filamentos axiais, com a parede celular de bactérias gram-negativas. Este cilindro protoplasmático consiste da parede celular, da membrana citoplasmática e conteúdo do citoplasma da célula bacteriana (Holt 1978, Joseph et al. 1973). Possuem dois filamentos axiais (Fig. 2)

localizados no periplasma, inseridos nas extremidades do corpo bacteriano, que atravessam as espirais em sentidos opostos (Holt 1978, Haake 2000).



Figura 2 – Componentes básicos da anatomia de superfície das espiroquetas (Adaptado de Holt 1978).

A sensibilidade da membrana externa a solventes e detergentes sugere que esta é uma estrutura quimicamente complexa, não se tratando de uma cápsula procariótica típica (Holt 1978), pois se apresenta fluida e lábil, o que contrasta com a membrana externa de bactérias gram-negativas (Haake 2000).

As leptospiras são difíceis de serem coradas com corantes usuais, como o método de Gram e, pelas dimensões reduzidas não são visualizadas por microscopia óptica convencional (Avelar & Pereira 2005). Técnicas especiais como microscopia de campo escuro ou contraste de fase (Faine 1982), colorações por métodos de deposição de prata (Blenden & Goldberg 1965) ou por conjugados imunocorados com fluoresceína ou imunohistoquímica, facilitam a visualização (Adler & Faine 2005).

No ano de 1982, o subcomitê taxonômico da leptospira adotou um sistema no qual toda leptospira patogênica foi designada numa única espécie – *Leptospira interrogans* (também conhecida como “complexo *Leptospira interrogans*”) – seguido do nome do sorovar. Todos os sorovares saprófitos foram colocados na espécie *Leptospira biflexa* (“complexo *Leptospira biflexa*”). Confusões surgem devido a denominação dos nomes das espécies *L. interrogans* e *L. biflexa* para as espécies patogênicas e saprófitas,

respectivamente. Isto pode ser evitado usando-se os termos “*strict sensu*” para se referir à espécie e “*lato sensu*” para o complexo (Adler & Faine 2005).

A técnica de hibridização do DNA permitiu a especificação de membros do gênero *Leptospira* (Brenner et al. 1999). Como resultado da classificação genética foi achado que muitos sorovares antigenicamente relacionados, ou mesmo subtipos do mesmo sorovar, podem pertencer a diferentes espécies. Por exemplo, subtipos antigenicamente indistinguíveis do sorovar hardjo (*hardjobovis* e *hardjoprajitno*) são classificados em *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*, respectivamente. Embora os dois subtipos sejam por definição sorovares idênticos, eles são referidos como sorovares *hardjobovis* e *hardjoprajitno* (Adler & Faine 2005).

Os meios utilizados para isolamento e cultivo são meios enriquecidos com soro de coelho ou albumina sérica bovina (BSA), além de meios livres de proteínas. Meios líquidos são convertidos em semi-sólido pela incorporação de 0,2% de agar e para forma sólida com a adição de 1% de agar. O meio líquido é necessário para crescimento das culturas (diagnóstico sorológico) e para tipificar os isolados. O semi-sólido 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 leptospiros. O meio sólido é utilizado para clonar estirpes e para isolar leptospiros de fontes contaminadas (Faine 1982).

Para o isolamento de leptospiros é essencial adicionar 5-fluorouracil (Johnson & Rogers 1964) ou uma combinação de antibióticos (Adler et al. 1986) com o objetivo de inibir o crescimento de bactérias contaminantes as quais podem impedir o isolamento (Hunter 2005).

Em laboratório, a temperatura ótima para o crescimento de saprófitas e patogênicas é de 28 - 30°C. O pH ótimo para crescimento é de 7,2 - 7,6; sendo que condições alcalinas são melhores toleradas que condições ácidas. Condições aeróbias são essenciais, por serem as leptospiros aeróbias

obrigatórias, e o crescimento é melhorado por agitação ou aumento da área de superfície (Adler & Faine 2005).

1.3 PATOGENIA

As leptospiros entram no organismo hospedeiro através de pequenos cortes ou abrasões, via membranas mucosas, tais como conjuntiva, ou possivelmente através da pele úmida. Elas se espalham imediatamente e vão para a corrente sanguínea, multiplicam-se ativamente no interstício e nos humores orgânicos (sangue, linfa e líquido), caracterizando um quadro agudo, septicêmico (leptospiremia). As lesões primárias são atribuídas à ação mecânica do microrganismo nas células endoteliais de revestimento vascular. As consequências diretas das lesões dos pequenos vasos são as hemorragias, seguidas da formação de trombos e do bloqueio de aporte sanguíneo nas áreas acometidas- enfartes (Faine 1982).

Essa fase de leptospiremia ocorre entre 1 – 7 dias da infecção e cessa com o aparecimento de anticorpos circulantes. Dessa forma há migração e persistência das leptospiros nos tecidos, especialmente nos túbulos renais proximais e no trato genital feminino (Blenden 1976, Ellis 1984), local privilegiado onde o agente fica protegido da imunidade humoral (Faine et al. 1999).

A presença das leptospiros nos túbulos proximais dos rins de portadores é o componente chave e central para a epidemiologia da leptospirose (Faine 1982). A excreção urinária de leptospiros é intermitente e pode ser de longa duração, na dependência dos hospedeiros animais acometidos e do sorovar de leptospira envolvido. Nos roedores infectados a presença de leptospiros na urina pode ser permanente. Nos animais de produção que são acometidos, as leptospiros têm sido evidenciadas tanto na urina como no sêmen e em secreções vaginais o que confirma não só a colonização dos

túbulos renais como também dos órgãos da reprodução e das suas glândulas anexas (Ellis 1994).

Nos túbulos renais proximais elas podem persistir por períodos de semana a anos ou serem freqüentes por toda a vida do animal, como ocorre em algumas associações hospedeiro-sorovar, especialmente nos roedores. Essa persistência por longos períodos resultará nas lesões renais. A base molecular para esta associação célula-bactéria é desconhecida e fatores de adesão específicos não são descritos. A excreção pela urina pode ser intermitente ou contínua e a concentração urinária da bactéria pode ser mais alta que 10^8 /mL. Imunoglobulinas anti-leptospiras estão presentes nos túbulos e bexiga, mas não matam as leptospiras, provavelmente devido a ausência de complemento. As leptospiras não sobrevivem bem em urina ácida, mas permanecem viáveis em urina alcalina. Conseqüentemente, animais herbívoros e aqueles cuja dieta resulte em urina alcalina são mais importantes como reservatórios que aqueles que produzem urina ácida (Adler & Faine 2005).

A partir da instalação do período de imunidade e leptospirúria, algumas lesões poderão ser estabelecidas, devido a persistência do microrganismo em locais específicos aonde ocorrem reações de hipersensibilidade do tipo III, nas quais há a deposição, nos tecidos, de imunocomplexos formados *in vivo*. É a partir deste mecanismo que são explicadas a lesão renal de nefrite intersticial crônica e a ocular, uveítes (Turner 1967).

Já a localização das leptospiras no trato reprodutivo das vacas resulta em infecção da placenta, infecção aguda do feto e algumas vezes em leptospirose congênita (Faine et al. 1999). Após a expulsão do feto, pode haver eliminação de leptospiras pelas descargas uterinas e a persistência dessas bactérias nas tubas uterinas por até 22 dias após o parto (Ellis 1984). A infecção pode persistir por até 142 dias em vacas prenhes e por 97 dias em vacas não prenhes (Thiermann 1984).

A leptospirose pode ocorrer como uma doença de forma aguda e grave em virtude da septicemia com evidência de toxemia, como hemorragia, hepatite, nefrite, meningite; como doença subaguda levemente grave, com nefrite,

hepatite, agalactia e meningite; ou como doença crônica, caracterizada por aborto, natimortos e infertilidade. A forma de manifestação da doença vai depender da espécie hospedeira (Radostits et al. 2000, Adler & Faine 2005).

Na forma aguda, a lesão primária danifica o endotélio de pequenas veias conduzindo a uma isquemia localizada em órgãos, resultando em necrose tubular renal, dano hepatocelular, meningite, miosite e placentite. Em casos severos ocorrem hemorragias, icterícia e freqüentemente deficiência de plaquetas. A liberação de linfocinas, como o fator de necrose tumoral (FNT- α) por monócitos através da atividade endotóxica das leptospiros pode explicar a lesão de células endoteliais e a conseqüente hemorragia observada na leptospirose grave. Há usualmente uma granulocitose branda e esplenomegalia. Danos teciduais, mesmo que severos, podem ser reversíveis e reparáveis por completo (por exemplo: rins e fígado), embora danos permanentes (miocardite) possam ser uma complicação (Adler & Faine 2005).

A patogênese da forma subaguda assemelha-se à forma aguda, com exceção de que a reação é mais branda. Acomete todas as espécies, sendo mais comum em bovinos e eqüinos (Radostits et al. 2000).

A forma crônica ocorre em animais convalescentes da forma aguda e está associada com danos renais e hepáticos que prejudicam o crescimento do animal. Nessa forma, em fêmeas prenhes, a infecção fetal resulta em aborto, natimortos e nascimento de bezerras fracas (Ellis 1984).

1.4 IMUNIDADE

Na leptospirose a imunidade a uma infecção inicial depende de mecanismos humorais, envolvendo a opsonização de leptospiros e fagocitose por macrófagos e neutrófilos (Mitchison et al. 1997, Faine et al. 1999). Os macrófagos conseguem fagocitar amostras de leptospiros apatogênicas sem a presença de anticorpos específicos. Já as amostras

patogênicas precisam estar opsonizadas para que ocorra a fagocitose por estas células (Marinho et al. 2003). A interação destas células, de complemento e anticorpos específicos, seria responsável pelo efeito bactericida sobre leptospiros patogênicas (Wang et al. 1984).

A primeira resposta sorológica relacionada à infecção é a produção de imunoglobulinas da classe M (IgM). Essas são desenvolvidas dentro de dois a 10 dias da infecção, dependendo da espécie e competência imunológica do animal e do tamanho da partícula antigênica (Adler & Faine 1976; Adler & Faine 1977). A produção de anticorpos IgG aparece com uma a duas semanas de infecção. Os níveis de anticorpos produzidos podem persistir durante semanas a meses, assim como por períodos de dois a 10 anos em humanos e por períodos comparáveis em animais, onde podem persistir por toda a vida (Faine et al. 1999).

O LPS da parede celular da leptospira contribui para a patogenia da doença e é função chave na imunidade à infecção (Adler & Faine 2005). Este LPS seria responsável por uma série de efeitos biológicos, *in vitro*, como estimulação da fagocitose, ativação do complemento e aumento da atividade mitogênica para linfócitos (Dobrina et al. 1995).

Embora o LPS seja o antígeno protetor predominante já se demonstrou que anticorpos anti-LPS de leptospiros não foram suficientes para proteger da infecção e da doença, bovinos vacinados contra o sorovar hardjo, com vacina pentavalente. Isso indica que pode haver outros mecanismos imunes que são importantes na proteção dos animais para alguns tipos de leptospiros (Bolin et al. 1989, Bolin et al. 1991). Sugere-se que uma resposta imune do tipo celular, para o sorovar hardjo, seja necessária para proteção e, dessa forma, uma vacina protetora teria que estimular este tipo de resposta imune também (Faine et al. 1999).

Como em outros mamíferos, o bovino apresenta perfil de células Th1 e Th2 (Brown et al. 1994). A resposta do tipo Th1 é um componente da imunidade mediada por células e é considerada necessária para resistência a patógenos intracelulares. Já a resposta do tipo Th2 promove uma resposta humoral e resistência a patógenos extracelulares. Naiman et al. (2001),

testaram a hipótese de que vacinas que protegem contra a bactéria *Leptospira borgpetersenii* sorovar hardjo induzem uma resposta imune, forte e sustentável, mediada por células. E como resultado observaram que para isso ocorrer, deve-se ter produção de Interferon- γ (INF- γ) por células T CD4 de bovinos vacinados em resposta a estimulação antigênica.

Assim, não somente a resposta humoral seria importante na contenção do processo infeccioso, mas também a resposta imune celular, pela produção de citocinas, como o Interferon- γ (INF- γ) e a atividade macrofágica (Marinho et al. 2003).

A imunidade pode ser conferida passivamente por antisoro ou por anticorpos monoclonais. Em mamíferos os anticorpos maternos são passados para o feto e neonatos por via transplacentária (IgG) e colostro (IgA) (Faine 1982). As quantidades de anticorpos dependerão do tipo de placenta e do nível de imunoglobulinas maternas. Nos bezerros, os anticorpos maternos podem persistir durante dois a seis meses. Em bovinos e no homem, fetos infectados de forma congênita produzem suas próprias IgM, caso já sejam imunocompetentes no útero (Faine et al. 1999).

1.5 SINAIS CLÍNICOS

A leptospirose é em muitos casos uma doença aguda, febril que ocorre em humanos e animais em todo o mundo. Os sinais de leptospirose em bovinos vão desde uma forma totalmente inaparente até uma forma aguda, febril e severa. Os sintomas clínicos não são específicos ou patognomônicos para leptospirose. A severidade da doença parece depender da idade e da imunidade do animal, do sorovar infectante, da concentração e virulência. Esses parâmetros também são determinantes na proporção de mortes em qualquer episódio epizootico (Faine et al. 1999).

A leptospirose clínica em bovinos pode ser dividida em duas fases distintas: uma fase aguda na qual o início dos sintomas coincide com a fase

de bacteremia da infecção; e uma fase crônica que afeta, de forma notável, o trato reprodutivo (Ellis 1984).

As manifestações clínicas mais freqüentes são as da esfera reprodutiva com abortamento, usualmente no terço final da gestação, infertilidade, esterilidade ou o nascimento de produtos a termo, debilitados, que morrem nos primeiros dias de vida (Ellis 1994). Nos bovinos, alguns sinais particulares podem ser observados; em bezerros pode ser observado um quadro febril com icterícia e hemoglobinúria o qual solicita o estabelecimento de um diagnóstico diferencial com a tristeza parasitária. Nas vacas adultas das raças com aptidão leiteira pode haver a infecção da glândula mamária com mastite atípica, diminuição da secreção de leite, úbere flácido e leite manchado por coágulos de sangue (Ellis 1994, Faine 1982).

Infecções acidentais em bovinos, como por exemplo, pelos sorovares grippotyphosa ou icterohaemorrhagiae, têm uma incidência maior de doença aguda e severa quando comparadas com infecções causadas pelo sorovar hardjo, para os quais são hospedeiros naturais. Em geral, infecções em hospedeiros naturais estão associadas com alta incidência de infecção subclínica e os sinais clínicos são mais freqüentemente associados com falhas reprodutivas e infertilidade em infecções crônicas (Faine et al. 1999).

Leptospirose aguda pode apresentar-se como uma doença severa em bovinos infectados com uma série de sorovares, particularmente o sorovar pomona. Os sinais clínicos incluem febre alta, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão pulmonar e, ocasionalmente, meningite e morte (Ellis 1984). Os bovinos que se recuperam podem ter o crescimento prejudicado e lesões renais significativas conduzindo a depreciação ou condenação de carcaças nos abatedouros. Em alguns casos, lesões detectadas nos abatedouros são ferramentas chave que conduzem a suspeita de leptospirose em rebanhos. Quando vacas prenhes são infectadas com estes sorovares esses animais podem abortar. Os abortos ocorrem associados com sinais clínicos em vacas, como febre e inapetência (Faine et al. 1999).

A síndrome clínica mais comum associada com leptospirose aguda ocorre em rebanhos leiteiros como uma febre transitória com queda súbita da produção de leite por dois a 10 dias (Pearson et al. 1980). Nesta “síndrome da queda do leite”, o leite fica amarelado, com consistência de colostro, contendo coágulos e alta contagem de células somáticas. Esta condição ocorre mais comumente com infecções por *hardjoprajitno*, mas pode ocorrer em infecções por *hardjobovis* ou outros sorovares. A recuperação é usualmente dentro de 10 dias, embora algumas vacas afetadas raramente retornam a sua produção máxima durante o período lactacional (Faine et al. 1999).

A forma crônica da leptospirose bovina, devido aos sorovares hardjo, está associada com infecção fetal em vacas prenhes, apresentando-se como abortos, natimortos, ou nascimento de bezerros prematuros e fracos infectados (Ellis 1994). Alguns bezerros infectados, porém aparentemente saudáveis, podem nascer. Recém-nascidos congenitamente infectados são fracos e afetados por degeneração do fígado e/ou rins, sendo propensos a infecções secundárias. Os que sobrevivem tornam-se portadores crônicos. No caso de infecções crônicas com estes sorovares, particularmente o sorovar hardjo, os abortos ou outras seqüelas reprodutivas, como morte embrionária, ocorrem semanas a meses após o início da infecção do animal prenhe. Esta falha na associação temporal entre os sinais clínicos e a infecção dificulta o diagnóstico, pois os títulos de anticorpos das vacas podem estar baixos ou caindo no período do aborto (Faine et al. 1999).

Infertilidade, a qual responde com antibioticoterapia, é descrita em rebanhos infectados por hardjo. Tal infertilidade, que inclui aumento do intervalo entre partos, aumento do período de serviço por concepção e perda embrionária não é bem caracterizada, mas ocorre devido a localização das leptospiros no útero e oviduto de bovinos infectados por hardjo (Dhaliwal et al. 1996b).

1.6 DIAGNÓSTICO

Embora a epidemiologia, histórico clínico, sintomas e achados após exame físico possam conduzir ao diagnóstico clínico, um diagnóstico laboratorial é requerido (Adler & Faine 2005).

O diagnóstico da leptospirose bovina é complicado devido aos sinais clínicos não serem patognomônicos para leptospirose e por haver necessidade de testes ao alcance, rápidos e sensíveis para o diagnóstico. O conhecimento epidemiológico da leptospirose no rebanho ou região ajuda a aumentar o nível de suspeita (Faine et al. 1999).

Em bovinos, uma síndrome hemolítica de leptospirose pode ser diferenciada de babesiose e anaplasiose, tão bem como de outras causas de anemia hemolítica. Causas de aborto, natimortos e/ou infertilidade incluem brucelose, campilobacteriose, clamidioses e tricomonoses e devem ser consideradas para diagnóstico clínico diferencial (Hunter 2005).

O diagnóstico laboratorial de leptospirose pode ser complexo e envolve dois grupos de teste. Um grupo de testes é designado a detectar anticorpos anti-leptospira (indireto) e o outro grupo de testes é designado a detectar leptospiras (direto), antígenos de leptospira ou ácido nucléico de leptospiras em tecidos animais ou fluido corporal. A seleção do teste dependerá do propósito do mesmo (teste de rebanho ou teste individual) e do teste disponível na região (OIE 2006).

O teste sorológico é o mais comumente utilizado como método diagnóstico em leptospirose, sendo o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) o padrão ouro. Esse teste detecta reações para qualquer classe ou classes de imunoglobulinas e a titulação comumente aceita como ponto de corte é 100 (OIE 2006).

O teste SAM é específico para o provável sorovar infectante ou sorovares antigenicamente relacionados. Dessa forma, antígenos selecionados para uso no SAM devem incluir estirpes representativas dos sorogrupos conhecidos na região onde se encontram os animais a serem testados, além

daqueles mantidos por espécies hospedeiras em outras localidades. Esta estratégia tem por objetivo aumentar as chances de detectar anticorpos anti-leptospira (Faine et al. 1999). Ao utilizar estirpes isoladas na região aumenta-se a sensibilidade do teste, sendo melhor que a das estirpes de referência. Porém estirpes de referência auxiliam na interpretação de resultados entre laboratórios (OIE 2006).

Muitos laboratórios utilizam um mínimo de seis a mais de 15 sorovares representativos dos sorogrupos comuns na região. Alguns laboratórios de referência utilizam sorovares representativos de todos os sorogrupos (Faine et al. 1999). A presença do sorogrupo é usualmente indicada pela frequência em triagem sorológica ou isolamento do sorovar de animais clinicamente afetados (OIE 2006).

A coleção de antígenos mantida por um laboratório que execute o teste SAM como método de rotina pode variar de uma localidade para a outra e também segundo as espécies animais cujos soros são examinados. No entanto para fins de vigilância epidemiológica é recomendável que as coleções sejam constituídas com pelo menos uma variante sorológica por sorogrupo e de algumas estirpes de importância regional (Faine 1982).

Quando o teste SAM é realizado em amostras representativas de rebanhos ou populações, os resultados são inicialmente trabalhados de modo a possibilitar a determinação da proporção de animais reatores, ou seja, o número de animais reagentes dentre os examinados com título > 100 para pelo menos um dos antígenos da coleção empregada (Faine et al. 1999).

A caracterização do sorovar com maior probabilidade de ser o responsável pela infecção é obtida por meio das reações dos diversos sorovares e seus respectivos títulos. Quando um mesmo animal reage para dois ou mais sorovares aceita-se que o responsável pela infecção é aquele em que a reação apresenta o título mais elevado. Caso haja empate nos títulos, ou seja, valores mais elevados idênticos para dois ou mais sorovares, este animal deve ser excluído da análise (Turner 1968).

As reações múltiplas obtidas em uma mesma amostra de soro com diferentes sorovares são interpretadas como coaglutinações. Esta condição é

relativamente freqüente entre sorovares pertencentes a um mesmo sorogrupo como é o caso do hardjo e wolffi, ambos do sorogrupo sejroe, e até com membros de sorogrupos distintos como é o caso do hebdomadis que possui grande semelhança antigênica com hardjo e wolffi; autumnalis com pomona ou grippotyphosa; australis com hardjo; ballum com canicola e andamana com icteroharmorrhagiae (Costa et al. 1998).

A especificidade do SAM é boa; anticorpos contra outras bactérias, usualmente não apresentam reação cruzada com leptospira. Entretanto há significativa reação cruzada entre sorovares de leptospira. Um animal infectado com um sorovar, provavelmente vai ter anticorpos contra o sorovar infectante e reagir cruzadamente com outro sorovar (usualmente com menor título e do mesmo sorogrupo) no SAM. Em adição, animais vacinados contra leptospirose podem ter anticorpos contra os sorovares presentes na vacina. Portanto, é importante considerar o histórico de vacinação dos animais testados. A vacinação difundida contribui significativamente no número de animais soropositivos e pode mascarar a presença da infecção crônica no rebanho, particularmente com o sorovar hardjo (OIE 2006).

Ao se fazer um diagnóstico sorológico de leptospirose, o sorovar infectante e a condição clínica envolvida devem ser considerados. No caso do sorovar pomona, ao induzir aborto em bovinos, um título alto é comumente achado no momento do aborto, porque a incidência clínica ocorre durante a fase aguda da infecção. Aborto em bovinos devido ao sorovar hardjo é um evento crônico; neste caso, a resposta sorológica no aborto é mais variável, com alguns animais soronegativos e outros mostrando altos títulos. Animais infectados podem abortar ou serem portadores renais ou genitais com títulos no SAM abaixo de 100 (diluição final). Isto porque os níveis de anticorpos séricos costumam declinar até valores indetectáveis em animais com infecção persistente. Bovinos podem ter uma queda da produção de leite durante a fase aguda da infecção por hardjo e este sinal clínico é associado com altos títulos (OIE 2006).

Em uma população endêmica, um título elevado não significa muito para o diagnóstico e é usual examinar soros pareados (amostras de fase aguda e

convalescente). Um aumento de quatro vezes nos títulos entre soros pareados é aceito na confirmação de casos de leptospirose. Entretanto, um diagnóstico presuntivo de leptospirose pode ser feito na presença de sinais clínicos sugestivos da doença e uma elevação singular do título (Cumberland et al. 1999).

No diagnóstico de infecções crônicas, as amostras de soros pareadas podem ter pouco valor, pois o aborto ocorre semanas após a infecção, quando os títulos já estão estáticos ou declinando. Em hospedeiros naturais, como os bovinos para o sorovar hardjo, os animais infectados em geral apresentam uma baixa resposta na produção de anticorpos aglutinantes em resposta a infecção (Bolin & Prescott 1999).

Em uma área não endêmica, um título ≥ 50 ou mais, com doença clínica compatível, indica leptospirose. Entretanto um título ≥ 400 permite somente um diagnóstico presuntivo, indicando contato prévio com leptospiras, as quais podem não ser a causa do problema em questão (Faine et al. 1999).

Considera-se que o aborto é causado por leptospira quando as vacas apresentam títulos iguais ou maiores que 400 para o sorovar hardjo e 800 para o sorovar pomona (Lemos & Almeida 2005).

Além do SAM, outros métodos podem ser utilizados no diagnóstico sorológico da leptospirose como ELISA (Enzime-linked immunoassay), reação de fixação do complemento, teste de hemoaglutinação, imunofluorescência, entre outros (Faine et al. 1999).

Já a demonstração do agente etiológico pode ser estabelecida por métodos de visualização (exame a fresco em campo escuro, coloração pela prata, imunofluorescência direta); métodos de cultivo; inoculação em animais de laboratório (hamster); e demonstração do ácido nucléico do agente infeccioso por biologia molecular (Faine et al. 1999, Richtzenhain et al. 2002).

O isolamento da leptospira permite o diagnóstico definitivo da infecção. A partir do sucesso no isolamento de uma estirpe de leptospira torna-se necessária a tipificação da amostra isolada que envolve o preparo de soro hiperimune seguido do encaminhamento da amostra e do respectivo anti-soro para laboratório de referência aonde será efetuada a tipagem por meio

do teste de absorção cruzada de aglutininas ou do emprego de uma coleção de anticorpos monoclonais. A identificação primária em nível do sorogrupo pode ser efetuada em laboratórios de rotina, desde que os laboratórios de referência forneçam anti-soros policlonais oficialmente controlados (Faine et al. 1999).

Em cães, bovinos e suínos naturalmente infectados, o isolamento de leptospiras tem sido realizado a partir de amostras de urina, rim, fígado, ovário e corpo de útero de matrizes, obtidas ao abate. Tais amostras são semeadas em meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) modificado (Freitas et al. 2004, Silva et al. 2005).

Outros estudos objetivam detectar leptospiras em cortes histológicos de fragmentos de rim, fígado ou útero, submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e a subsequente prova de imunoperoxidase indireta com soros hiperimunes contra um sorovar de interesse, como hardjo e canicola, utilizados como anticorpo primário (Silva et al. 2005).

1.6.1 Considerações teóricas sobre estimativas de prevalência e de variáveis de risco

Uma das medidas de frequência com que uma determinada doença ocorre em uma população é a prevalência. Ela expressa o número de casos existentes de uma doença em um dado momento e pode ser calculada como prevalência aparente (Pa) e prevalência real (Pr). A Pa é estimada considerando o número de animais diagnosticados como reagentes em uma população de animais testados. Já para o cálculo da Pr , esta deve ser estimada ajustando-se o valor da Pa para a sensibilidade e especificidade do teste utilizado no diagnóstico. A Pr indica a verdadeira proporção de animais infectados (Martin et al. 1987, Thrusfield 1995, Gordis 1996).

A sensibilidade (Sen) e especificidade (Esp) são utilizadas para avaliar a performance de um teste de diagnóstico. A Sen é definida como a probabilidade de um animal infectado ser classificado como positivo pelo teste de diagnóstico. Já a Esp é a probabilidade de um animal sadio (não infectado) ter resultado negativo no teste de diagnóstico. Testes que apresentem baixa sensibilidade resultam em maior número de resultados falso-negativos e testes de baixa especificidade resultam em maior número de falso-positivos (Noordhuizen et al. 1997, Belchior 2000, Brasil 2005).

Em geral, a Sen de um determinado teste é inversamente proporcional a Esp, e dependem do valor a partir do qual se classifica os animais como positivos ao teste (ponto de corte). Se o ponto de corte do teste diagnóstico for modificado para aumentar a sensibilidade, a especificidade diminuirá. De maneira inversa, se o ponto de corte do teste diagnóstico for modificado para elevar a especificidade, haverá perda da sensibilidade (Noordhuizen et al. 1997, Belchior 2000, Brasil 2005).

A proporção de falso-positivos é muito influenciada pela especificidade do teste utilizado, qualquer que seja a prevalência da doença. Para valores de prevalência muito baixos, mesmo um teste de boa especificidade (99%), resulta em alta proporção de falso-positivos. Assim, quando o diagnóstico é realizado em populações de baixa prevalência, deve ser utilizado teste de especificidade próxima de 100% (Brasil 2005).

Além da determinação da Pa e Pr para animais, para rebanhos também é calculada (PaR e PrR), sendo que para estimar a PrR, considera-se o valor da sensibilidade e especificidade de rebanho (SenR e EspR). Entende-se como SenR a probabilidade de se encontrar pelo menos um animal positivo em um rebanho considerado doente. E a EspR como sendo a probabilidade de não se encontrar nenhum animal positivo em um rebanho sadio, ou seja, um rebanho não infectado ser corretamente classificado como negativo pelo teste aplicado nos animais. A EspR diminui com o aumento do número de animais testados no rebanho, enquanto que a sensibilidade de rebanho aumenta. A SenR também aumenta com o aumento da prevalência, já a

EspR não é, por definição, influenciada por ela (Martin et al. 1987, Martin et al. 1992)

Uma PrR apresentaria valores idênticos ao da PaR se a SenR e EspR fossem, ambas, 100%. Caso a SenR apresente valor inferior ao máximo, ou seja, o teste não consegue detectar 100% dos rebanhos positivos, teoricamente, ainda faltam rebanhos a serem diagnosticados, e a PrR será, então, superior a PaR (Martin et al. 1987, Martin et al. 1992, Belchior 2000).

Em situações reais, o verdadeiro estado sanitário do rebanho (infectado ou não) não é conhecido, mas sim o resultado do teste. Por essa razão, é importante saber a proporção de rebanhos com resultado positivo, que realmente estão infectados – valor preditivo positivo (VPP), e a proporção de rebanhos com resultado negativo que não estão infectados – valor preditivo negativo (VPN). Esses parâmetros são determinados pelos valores de Sen e Esp do teste utilizado e pela prevalência da doença na população submetida ao diagnóstico, ou seja, variam em função da situação epidemiológica. No caso do cálculo dos VPP e VPN para rebanhos deve-se considerar a SenR, EspR e PrR (Noordhuizen et al. 1997, Belchior 2000, Brasil 2005).

O termo doença é descrito como resultado de uma tríade epidemiológica: hospedeiro, agente e meio ambiente. Dessa forma, uma variedade de fatores, sejam inerentes ao hospedeiro, ao agente ou ao ambiente, irão favorecer ou não a ocorrência da enfermidade. As pesquisas em epidemiologia têm progredido através da análise estatística da associação entre variáveis de risco e doença. Uma variável será considerada causa contribuinte de uma doença (fator de risco), se a frequência da doença é aumentada pela sua presença e reduzida pela sua ausência (Pereira 1995, Gordis 1996).

Uma das medidas de associação entre exposição e doença utilizada é a *odds ratio* ou “razão de chances”. *Odds ratio* é a razão entre o número de eventos observados e o número de eventos não observados. Essa medida de risco é razão (*ratio*) de razões (*rates*) para expressar quantas vezes uma medida de ocorrência (*rate*) é maior numa situação comparada com outra.

Então, *odds ratio*, também chamado de razão de chances, permite identificar uma possível associação causal (Pereira 1995, Gordis 1996).

O risco de ficar doente entre os expostos é bem maior que o risco de ficar doente dos não expostos. Os controles são selecionados a partir da população em estudo por processo de amostragem. Toda a amostra por melhor que seja feita está sujeita ao acaso, e é por isto que o *odds ratio* deve ser expresso na forma de intervalo de confiança, calculado a partir de uma margem de erro pré-determinada. O tamanho da amostra não afeta o *odds ratio*, mas afeta seu intervalo de confiança. Ao calculá-lo observa-se que quanto maior a amostra em estudo menor será o intervalo de confiança. Se o objetivo for medir associação positiva entre um possível fator de risco e o evento da doença, o limite inferior do intervalo é o elemento importante. Este deve ser maior que 1 para afirmarmos que em dado intervalo de confiança há associação (Rumel 1986).

1.7 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é uma doença de distribuição cosmopolita. Já foi diagnosticada em todos os continentes, exceto nas regiões polares, e em quase todos os países do mundo (Blaha 1995). A enfermidade tem uma alta prevalência em países de clima tropical, em decorrência das grandes precipitações pluviais e ao tipo de solo, neutro ou alcalino (Acha & Szyfres 1986).

Para compreensão da epidemiologia da leptospirose, essa é classificada em duas categorias: leptospirose adaptada ao hospedeiro e leptospirose não adaptada ao hospedeiro. Um animal infectado por um sorovar adaptado ao hospedeiro é considerado um hospedeiro natural ou reservatório. Já um animal infectado por um sorovar não adaptado ao hospedeiro é considerado um hospedeiro acidental. Assim a leptospirose é uma antropozoonose que tem como hospedeiros naturais os animais selvagens, sinantrópicos e

domésticos. Os seres humanos comportam-se como hospedeiros terminais, acidentais (Levett 2004).

Um hospedeiro natural caracteriza-se por: elevada susceptibilidade à infecção; transmissão endêmica entre as espécies hospedeiras; patogenicidade relativamente baixa para seu hospedeiro; tendência a causar doença crônica, provocando perda econômica devido as suas perdas reprodutivas; persistência dos sorovares nos rins e trato genital; discreta produção de anticorpos e baixa eficácia da vacinação para prevenir a infecção (Levett 2004).

Um hospedeiro acidental é caracterizado por: susceptibilidade à infecção relativamente baixa; patogenicidade elevada para o hospedeiro; tendência de provocar doença aguda grave, e não doença crônica; transmissão esporádica entre os hospedeiros e infecção por outras espécies, algumas vezes em forma de epidemia; curta fase renal; grande produção de anticorpos contra a infecção, facilitando o diagnóstico; vacinas mais eficazes para a prevenção da infecção (Radostits et al. 2000).

Exemplos de sorovares adaptados e não adaptados ao hospedeiro estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Sorovares comuns da leptospirose e seus hospedeiros naturais e acidentais

Sorovares	Hospedeiro natural	Hospedeiro acidental
hardjo	bovinos	ovinos e homem
bratislava	suínos e eqüinos	
pomona	suínos, doninha-fedorenta, mão-pelada e gambás	ovinos e bovinos
grippotyphosa	mão-pelada, gambá e esquilo	ovinos e bovinos
icterohaemorrhagiae	rato-pardo	bovinos e suínos

Fonte: Adaptado de Radostits et al. 2000

Os principais tipos de sorovar hardjo, *hardjoprajitno* e *hardjobovis*, apresentam diferenças quanto à genética, localização tecidual e reposta imune à infecção e tem sido identificadas em isolados do sorovar hardjo de diferentes partes do mundo (Faine et al. 1999). O genótipo *hardjoprajitno* parece ser mais virulento que o sorovar *hardjobovis*, embora infecções por *hardjobovis* sejam associadas com falhas reprodutivas em bovinos (Dhaliwal

et al. 1996a; Dhaliwal et al. 1996b). A distribuição dos isolados e a prevalência dos sorovares variam de acordo com as regiões do país (Miller et al. 1991). Qualquer leptospira pode infectar qualquer espécie animal, mas apenas um pequeno número de sorovares pode ser endêmico em uma região particular ou país (Ellis 1984).

Parece que bovinos, em todo o mundo, são mais comumente infectados com *Leptospira borgpetersenii* sorovar hardjo, tipo *hardjobovis*, para as quais são hospedeiros naturais, porém são infectados também, como hospedeiros acidentais, por uma variedade de sorovares que são comuns dentro de localizações específicas (Faine et al. 1999).

As leptospirosas podem infectar diversos grupos de animais vertebrados, no entanto, na atualidade os mamíferos são os que apresentam maior significado epidemiológico. Investigações executadas em ecossistemas silvestres, não modificados pela ação humana, referem a presença de infecção em roedores, marsupiais, carnívoros e edentados, no entanto nos ecossistemas rurais e urbanos o principal reservatório de leptospirosas são os roedores sinantrópicos entre os quais o *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto) ocupa uma posição de destaque (Vasconcellos 1987). Saliente-se que neste último grupo de animais a relação hospedeiro-parasita revela uma condição de equilíbrio, na qual os animais acometidos usualmente não exteriorizam qualquer sinal da infecção (Faine 1982).

Os mamíferos domésticos de produção, trabalho e companhia são suscetíveis e acometidos por leptospirosas tanto nas áreas rurais como urbanas (Vasconcellos 1993, Vasconcellos 1997). Os humanos quase nunca se tornam portadores crônicos, mas sofrem de infecção aguda, às vezes com seqüelas (Adler & Faine 2005).

1.7.1 Fatores de risco ligados ao animal

Na leptospirose as fontes de infecção são os animais selvagens, sinantrópicos e domésticos que podem assumir as modalidades de doentes típicos, atípicos ou de portadores sadios (roedores silvestres e sinantrópicos) e portadores convalescentes (animais de produção e companhia) (Côrtes 1993).

As vias de eliminação relacionadas com a disseminação da leptospirose animal incluem urina, sêmen, produtos do abortamento e as secreções vaginais (Ellis et al. 1986). Os mecanismos de contágio podem ser por meio do contato com alimentos, água ou fômites contaminados, pela prática da inseminação artificial quando o sêmen é colhido de doadores infectados, e por transmissão venérea pela cópula (Sleight & Willian's 1961, Faine et al. 1999).

A transmissão da leptospirose depende de condições favoráveis para sobrevivência do agente no meio (clima), do número de portadores animais na população, do tempo em que esses animais permanecem como reservatórios de leptospiras e do grau de contato entre hospedeiros naturais e hospedeiros acidentais (Levett 2004; Hunter 2005). A ferramenta chave na transmissão da leptospirose entre animais e entre animais e o homem é a infecção dos túbulos renais e excreção de leptospiras pela urina de animais portadores (Faine et al. 1999). A urina pode resultar em transmissão direta da infecção via contaminação das membranas mucosas de outro animal, ou transmissão indireta via contaminação do meio ambiente. Em algumas espécies, a persistência do microrganismo no trato reprodutivo é também importante e pode resultar em transmissão venérea de leptospirose (Faine et al. 1999).

A transmissão da leptospirose via inseminação artificial ainda é discutível, pois, além do controle sanitário dos doadores de sêmen (Heinemann et al. 2000), estudos sobre novas combinações de antibióticos acrescentados aos

diluidores de sêmen oferecem métodos seguros para o bloqueio desta via de transmissão (Miraglia et al. 2003).

1.7.2 Fatores de risco relacionado ao ambiente e ao manejo

Fatores como tipo de ocupação, geografia, organização social e clima contribuem para a prevalência da leptospirose (Faine et al. 1999). A incidência de infecção é muito mais alta em países de clima tropical que em temperados. Isto devido a uma maior sobrevivência das leptospiras em meio tropical, condições úmidas e maior oportunidade de exposição ao homem. A incidência de leptospirose é sazonal, com picos no verão ou outono em regiões temperadas, onde a temperatura é um fator limitante na sobrevivência das leptospiras, e durante a estação chuvosa em regiões de clima tropical, onde a rápida dissecação impede a sobrevivência dos organismos no meio (Levett 2004).

O índice de isolamento de um sorovar relaciona-se mais com a temperatura da região do que com a quantidade de precipitação, o que sugere não ser necessário um índice elevado de chuvas para a transmissão da leptospirose (Miller et al. 1991). Porém em virtude da importância da água como meio de disseminação da infecção, haverá maior probabilidade de ocorrerem novos casos em estações úmidas e áreas planas, principalmente quando a contaminação e susceptibilidade forem elevadas (Radostits et al. 2000).

Em bovinos de leite, alguns fatores relacionados ao manejo são identificados como possíveis de aumentar o risco de infecção do rebanho pelo sorovar hardjo, como: aquisição de bovinos infectados; bovinos e ovinos coabitando o mesmo pasto; aquisição ou empréstimo de touro contaminado; acesso de bovinos a fontes de água contaminada, como riachos, rios, alagamentos ou drenagem de água (Bennett 1993).

A sobrevivência da leptospira no meio ambiente, em ausência de parasitismo, depende de variações de temperatura e umidade. Seca e valores de pH abaixo de seis ou acima de oito não são favoráveis para sua sobrevivência fora do organismo hospedeiro. A bactéria pode sobreviver por um período de até 183 dias em solos úmidos, e menos de 30 minutos em solos secos. Águas estagnadas permanecem contaminadas por leptospiros vivas por períodos prolongados (Blenden 1976, Hunter 2005). São muito sensíveis frente aos desinfetantes tradicionais (pH < 5 e > 11), assim como ao calor e a dessecação. São sensíveis à maioria dos antibióticos, porém mostram uma resistência natural as sulfamidas (Blaha 1995), sendo resistente também ao cloranfenicol (Faine et al. 1999).

1.7.3 Implicações econômicas

A leptospirose é uma importante causa de perdas econômicas na pecuária. A maioria das infecções por leptospirose é subclínica e associada a infecções fetais que provocam aborto, parto de natimortos e o nascimento de neonatos fracos com alta taxa de mortalidade em bovinos, ovinos, eqüinos e suínos. Em bovinos, epidemias de aborto, infertilidade e aumento da incidência de descartes causam significativas perdas econômicas. Epidemias de agalactia em bovinos de leite e a síndrome da queda de produção de leite, associam-se a infecções pelo sorovar hardjo (Ellis 1984).

1.7.4 Implicações zoonóticas

No homem a leptospirose também é conhecida como doença de Weil, febre dos arrozais, febre dos canaviais, além de outras denominações locais (Acha & Szyfres 1986).

A ocorrência da enfermidade no homem varia nas diferentes partes do mundo, podendo ocorrer de forma esporádica ou de surtos epidêmicos. Em geral, os surtos se produzem por exposição a águas contaminadas com urina de animais infectados. Vários grupos ocupacionais estão especialmente expostos, tais como trabalhadores de arrozais, canaviais, minas, matadouros, criadores de animais e médicos veterinários (Heath & Johnson 1994, Faine et al. 1999).

A severidade da leptospirose em humanos varia com o sorovar infectante, idade, condições de saúde e nutricionais do paciente. Ela pode apresentar-se como uma gripe branda até uma infecção severa com falha renal e hepática, angústia respiratória, miocardite, hemorragia e morte (Adler & Faine 2005).

1.7.5 Leptospirose bovina no Brasil

No Brasil, a doença é endêmica, e pode acarretar contaminação de quase todo o rebanho (Salles & Lilenbaum 2000). Sorovares de leptospirosas como pomona (Freitas et al. 1957) e icterohaemorrhagiae (Santa Rosa et al. 1961), já foram isolados de bovinos no país. Os inquéritos sorológicos realizados entre os bovinos, no território brasileiro, evidenciam como importantes os seguintes sorovares: hardjo, wolffi, pomona, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae e canicola, sendo o sorovar hardjo destacado como o mais importante no mundo (Girio & Lemos 2002).

Em estudo realizado em bovinos provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo, Langoni et al. (2000), revelaram que 45,56% das amostras de soro testadas foram positivas para leptospirose, com predominância dos sorovares wolffi (70,59%) e hardjo (67,57%).

No distrito municipal de Garanhuns, estado do Pernambuco, Oliveira et al. (2001), testaram bovinos leiteiros e encontraram que 47,63% das amostras de sangue foram positivas para um ou mais sorovares, com maior prevalência do sorovar hardjo (21,98%).

No município de Uruará, Pará, Homem et al. (2001) encontraram prevalência sorológica da leptospirose bovina por propriedade de 97% (90,9 - 99,5%), quando consideradas reações para qualquer dos sorovares empregados como antígenos. As reações contra os sorovares hardjo e bratislava foram as mais freqüentes, 61,2% e 9%, respectivamente. No Rio de Janeiro, Lilenbaum & Souza (2003) detectaram anticorpos anti-leptospira em 46,9% das vacas testadas, com predominância do sorovar hardjo.

No período de 1984 a 1997, Favero et al. (2001) realizaram pesquisa das variantes sorológicas de leptospira predominantes em vinte e um estados do Brasil. Os resultados revelaram 84,1% das propriedades com pelo menos um animal positivo, variando de 74% a 100%, incluindo rebanhos positivos em todos os vinte e um estados. Neste estudo, no Mato Grosso do Sul, a proporção de propriedades com pelo menos um animal positivo foi de 100%. Quanto aos animais reatores para pelo menos uma variante sorológica de *Leptospira* spp a proporção foi de 62,3%, prevalecendo os sorovares hardjo (51,5%) e wolffi (24,2%).

Em estudo realizado na região de Nhecolândia, MS, Girio et al. (2004) encontraram prevalência de animais sororeagentes para leptospira em 41% dos búfalos (*Bubalus bubalis*) e em 40,3% dos bois baguás (*Bos taurus indicus*) testados, com os sorovares pomona e wolffi como os mais prevalentes para os respectivos animais. Madruga et al. (1980) estudaram 670 bovinos da região Sul do Cerrado, do então estado de Mato Grosso e obtiveram 505 (74,5%) amostras positivas, sendo os sorovares hardjo, sejroe, wolffi, australis e grippotyphosa mais prevalentes.

Pellegrin et al. 1999, com o objetivo estimar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* em bovinos do Pantanal Mato-grossense, examinaram 28 propriedades e por meio da técnica de microaglutinação rápida, 756 animais. Foram encontrados animais reagentes em todas as propriedades estudadas. A prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* sp para, pelo menos um sorovar testado foi de 38,88%. A frequência de animais reagentes nas propriedades estudadas variou de 10 a 84%. Os sorovares para as quais os soros testados mais freqüentemente reagiram foram o hardjo, wolffi e sejroe.

1.8 CONTROLE

As medidas de controle devem ser aplicadas em cada um dos componentes da cadeia de transmissão: fontes de infecção, vias de transmissão e susceptíveis. Como medidas de controle, as fontes de infecção precisam ser identificadas por meio de diagnóstico, combatidos os reservatórios sinantrópicos, separados e tratados os animais de produção e companhia e adotadas medidas de vigilância epidemiológica dos doadores de sêmen e dos comunicantes. As vias de transmissão devem ser saneadas por meio de drenagem, destino adequado de excretas, cadáveres e restos de animais, higiene e desinfecção das instalações e equipamentos zootécnicos, armazenagem adequada de alimentos. Controle sanitário da inseminação artificial. Aos suscetíveis, deve ser empregada proteção específica através do emprego de imunógenos preparados com os sorovares de leptospiros predominantes na região (Faine 1982)

O Combate aos reservatórios sinantrópicos (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*) incluem a modificação ambiental, as medidas preventivas, como construções a prova de roedores, as medidas ofensivas, como o uso de raticidas e a educação em saúde (Faine 1982).

Animais doentes ou soropositivos podem ser separados dos animais não infectados, permanecendo isolados, e tratados com antibiótico com o objetivo de erradicar a leptospira dos rins. Solo, telhado e qualquer outro lugar que tenha sido contaminado com urina desses animais devem ser lavados com desinfetantes. Suínos devem ser isolados de bovinos, ovinos, caprinos, pois esses animais apresentam uma maior concentração de leptospiras na urina e as mantêm por muito mais tempo que bovinos ou outros animais domésticos. Da mesma forma, os cães também devem ser isolados dos outros animais (Faine 1982).

O tratamento dos animais de produção e companhia, do ponto de vista preventivo tem o objetivo reduzir o potencial de transmissibilidade. Neste particular no controle da leptospirose animal deve ser considerado o uso racional de antibióticos que bloqueiem a eliminação de leptospiras através da urina, sêmen e secreção vaginal. A estreptomicina aplicada pela via parenteral, usualmente na concentração de 25 mg/kg de peso vivo, têm sido a medicação de escolha (Guimarães et al. 1983).

O tratamento com antibioticoterapia é efetivo dentro dos primeiros 7-10 dias de infecção. Devendo ser administrado imediatamente após o diagnóstico ou suspeita. Esse tratamento rápido pode reduzir a progressão dos sintomas e a probabilidade de seqüelas, com isso prevenindo uma manifestação mais severa da infecção. O antibiótico eliminará as leptospiras dos tecidos mais acessíveis, mas não reverterá mudanças patológicas já estabelecidas e tratadas sintomaticamente (Adler & Faine 2005).

Os sinais clínicos de leptospirose aguda poderão melhorar seguindo o tratamento com estreptomicina (12,5 mg/Kg; duas vezes ao dia por três dias), ou tetraciclina (10-15 mg/Kg, duas vezes ao dia por três a cinco dias). O tratamento com estreptomicina pode ser combinado com ampicilina ou com altas doses de benzil penicilina. Uma dose única de estreptomicina (25 mg/Kg) usualmente remove o estado de portador renal crônico causado pelo sorovar pomona e outros (Faine et al. 1999).

A proteção específica, por meio do emprego de vacinas aplicadas aos suscetíveis, consiste na primo-vacinação dos animais de produção, suínos e

bovinos, aos três ou quatro meses de idade, dose de reforço aos 30 dias da primeira aplicação e revacinações semestrais ou anuais conforme as condições ambientais; quanto maior o risco de exposição (topografia do terreno e grau de umidade), menor deve ser o intervalo entre as revacinações. Para a organização mundial de saúde animal, a vacinação anual de todos os bovinos em um rebanho fechado, ou duas vacinações ao ano em rebanhos abertos, pode ser eficiente para o controle. A imunidade vacinal deve persistir por no mínimo seis meses (OIE 2006).

Vacinas de leptospiras para uso em veterinária são suspensões de uma ou mais estirpes de leptospiras patogênicas inativadas de tal maneira que a atividade imunogênica é mantida. Uma vacina deve ser formulada para uso em uma espécie animal em particular e em uma região geográfica particular. Ela deve conter somente aqueles sorovares – e preferencialmente, aqueles genótipos – que causam problemas na espécie animal ou que são transmitidas de uma espécie animal a outra na região (OIE 2006).

Muitas vacinas comerciais estão disponíveis no Brasil, as quais são constituídas por cinco ou seis sorovares, que correspondem aos mais prevalentes no País (Genovez et al. 2004).

As bacterinas anti-leptospirose de uso animal são controladas segundo protocolos internacionais que incluem testes de inocuidade e de potência (Bey & Johnson 1986), no entanto a despeito de atenderem estas exigências foi constatado que em algumas ocasiões os animais vacinados adquirem proteção contra a doença, mas não contra a infecção e podem eliminar leptospiras via urina (Bolin 2003).

A vacinação, embora não tenha sua eficácia confirmada, pode reduzir o número de animais susceptíveis e proporcionar algum grau de segurança. Produtores com rebanhos que apresentem um risco elevado de infecção provavelmente escolherão a vacinação. Variações na eficácia de vacinas para o sorovar hardjo resultam da composição vacinal e patogenicidade das estirpes prevalentes na região (Faine et al. 1999).

Há o consenso de que a proteção é sorovar específica (Prescott et al. 1991), no entanto têm sido investigada a proteção cruzada entre

representantes de um mesmo sorogrupo (Costa et al. 1998, Tabata et al. 2002).

A interferência da vacinação nos resultados dos testes de diagnóstico têm sido investigada e parece ser possível o ajuste de concentrações de antígeno vacinal de modo a ser conferida a proteção exigida com pouca influência nos resultados dos testes sorológicos (Favero et al. 1997).

O monitoramento sorológico sistemático dos rebanhos submetidos a programas de vacinação contra leptospirose pode ser uma boa ferramenta para avaliar a proteção dada pela vacina. Na pós-vacinação, o decréscimo progressivo dos títulos pode representar eficiência da vacina, enquanto altos títulos (>1600) podem significar que outras estirpes de leptospiras ou um novo sorovar entraram em circulação no rebanho estimulando a resposta humoral e indicando escape vacinal (Genovez et al. 2004).

Tem-se a necessidade de isolamento de novos sorovares que ocorrem no rebanho, pois a manutenção dos antígenos indefinidamente, em meios de cultura com repiques freqüentes, pode selecionar variantes que diferem daquelas encontradas no ambiente. A adoção de um programa de controle de leptospirose pode incluir uma vacina dirigida para uma região em particular, usando-se variantes isoladas no local (bacterina autógena) (Tizard 2002),

Em síntese, a profilaxia e controle da leptospirose dependem da identificação do sorovar predomnante na propriedade, o que indica quais mecanismos de transmissão estão presentes. No caso de infecções incidentais, determinadas por sorovares que não são mantidos pelos bovinos, como pomona, icterohaemorrhagiae ou bataviane, entre outros, deve-se identificar de que forma o rebanho está sendo exposto ao contato com os reservatórios naturais destas variedades, como ratos e animais silvestres. Somente desta forma se poderá, por meio de medidas de higiene e tecnificação da criação como um todo, controlar a leptospirose no rebanho. No entanto, quando a infecção é determinada pelo sorovar hardjo, cuja principal forma de transmissão é de bovino a bovino, três medidas devem ser praticadas simultaneamente: proibir a introdução de animais no rebanho,

salvo quando negativos ao sorodiagnóstico ou previamente tratados com dihidroestretomicina; tratar os animais sororeagentes do rebanho com dihidroestretomicina 25 mg/kg/pv, em dose única; fortalecimento da imunidade utilizando uma vacina que contenha as principais variedades presentes na região, incluindo, se possível, amostras locais (Lilenbaum 1996, Del Fava et al. 2003).

O conhecimento da apresentação da leptospirose, da sua distribuição geográfica, dos fatores de risco envolvidos e das estirpes circulantes é de extrema importância para o estabelecimento da epidemiologia regional da doença e aprimoramento de medidas preventivas. No artigo a seguir, são apresentados os resultados de prevalência e variáveis de risco em rebanhos de Mato Grosso do Sul, com destaque aos sorovares de leptospira predominantes numa região compreendida por 22 municípios.

REFERÊNCIAS

- Acha P.N. & Szyfres B. 1986. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Parte I: Bacteriosis - Leptospirosis. 2a edicion. Organization Mundial de la Salud, Genova. p.112-119.
- Adler B. & Faine S. 2005. The Genus *Leptospira*. The Prokaryotes. 3ª.ed. Disponível em: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/311/COMPLETE.htm>. Acesso em: 22/08/2005.
- Adler B. & Faine S. 1977. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect. Immun.* 17: 67-72.
- Adler B. & Faine S. 1976. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to letal infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Infect Immun.* 14: 703-708.
- Adler B., Faine S., Christopher W.L. & Chappel R.J. 1986. Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical material. *Vet. Microbiol.* 12(4): 377-381.
- Avelar K.E.S. & Pereira M.M. 2005. Espiroquetídeos. In: Trabulsi L.R. & Alterthum F. *Microbiologia*, 4ª ed. Editora Atheneu, São Paulo. p. 399-408.
- Belchior A.P.C. 2000. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 55p.
- Bennett R.M. 1993. Decision support models of leptospirosis in dairy herds. *Vet. Rec.* 132(3): 59-61.
- Bey R.F. & Johnson R.C. 1986. Current status of leptospiras vaccines. *Progress Vet. Microbiol. Immun.* 2: 175-197.
- Blaha T. 1995. *Epidemiología Especial Veterinaria*. 1ª ed. Editorial Acribia, S.A: Espanha. p.128-136.
- Blenden D.C. 1976. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. In: Reunion Interamericana sobre el Controle de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis, 8, Guatemala, 1975. Washington, Organizacion Panamericana de La Salud, p.160-168, (Publicacion Científica, 316).
- Blenden D.C. & Goldberg H.S. 1965. Silver impregnation stain for *Leptospira* and Flagella. *J. Bacteriol.* 89(3): 899-900.

- Bolin C.A., Cassells J.A., Zuerner R.L. & Trueba G. 1991. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis vaccine on type hardjobovis infection of cattle. Am. J. Vet. Res. 52: 1639-1643.
- Bolin C.A., Zuerner R.L. & Trueba G. 1989. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. Am. J. Vet. Res. 50:2004–2008.
- Bolin C.A. & Prescott J.F. 1999. Leptospirosis. In: Howard J.L. & Smith R.A. Current Veterinary Therapy. 4^a.ed. Philadelphia : Saunders, v.1, p.352-357.
- Bolin C.A. 2003. Diagnosis and Control of Bovine Leptospirosis. Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference. Reno, NV—155.
- Brasil. 1995. Ministério da Saúde. Manual de Leptospirose. 2^a ed. rev. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 98p.
- Brasil 2005. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose PNCEBT. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 188p.
- Brenner D.J., Kaufmann A.F., Sulzer R., Steigerwalt A.G., Rogers F.C. & Weyant R.S. 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 839–858.
- Brown W. C., Woods V. M., Chitko-McKown C. G., Hash S. M. & Rice-Ficht A. C. 1994. Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. Infect. Immun. 62: 4697–4708.
- Cervantes L.P.M., Puebla M.A.C., Rosas D.G., Serranía N.R. & Barranca J.I.T. 2002. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. Rev. Cubana Med. Trop. 54(1): 24-27.
- Côrtes J.A. 1993. Epidemiologia: Conceitos e princípios fundamentais. Livraria Varela: São Paulo. 227p.
- Costa M.C.R., Moreira E.C., Leite R.C. & Martins N.R.S. 1998. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 50(1): 11-17.

- Cumberland P., Everard C.O.R. & Levett P.N. 1999. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(5): 731-734.
- Del Fava C., Arcaro J.R.P., Pozzi C.R., Arcaro Júnior I., Fagundes H., Pituco E.M., De Stefano E., Okuda L.H, Vasconcellos S.A. 2003. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 70(1): 25-33.
- Dhaliwal G.S., Murray R.D., Dobson H., Montgomery J. & Ellis W.A. 1996a. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. *Vet. Rec.* 139: 110-114.
- Dhaliwal G.S., Murray R.D. & Ellis W.A. 1996b. Reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo relative to the year of diagnosis. *Vet. Rec.* 138: 272-276.
- Dobrina A., Nardon E., Vecicle E., Cinco M. & Patriarca P. 1995. *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira peptidoglycans* induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 63: 2995-2999.
- Ellis W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10: 463-478.
- Ellis W.A., Cassells J.A. & Doyle J. 1986. Genital leptospirosis in bull. *Vet. Rec.* 118: 333.
- Ellis W.A. 1984. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Prev. Vet. Med.* 2: 411-421.
- Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. 2^a ed. MediSci, Melbourne, Vic. Australia. 272p.
- Faine S. 1982. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization, Geneva. 171p.
- Favero M., Pinheiro S.R., Vasconcellos S.A., Morais Z.M., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2001. Leptospirose bovina - variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 68(2): 29-35. jul./dez.

- Favero A.C.M., Mangerona A.C.S., Alessi L.J., Morais Z.M., Pinheiro S.R., Ferreira Neto J.S. & Vasconcellos S.A. 1997. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra a leptospirose. Influência de reações pré-vacinais, homólogas e heterólogas. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 64(2): 45-55.
- Freitas J.C., Silva F.G., Oliveira R.C., Delbem A.C.B., Muller E.E., Alves L.A. & Teles P.S. 2004. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. Cienc. Rural. 34(3): 853-856.
- Freitas D.C., Lacerda Júnior P.M.G., Veiga J.S. & Lacerda J.P.G. 1957. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. Rev. Facul. Med. Vet. Zootec. São Paulo. 6(1): 81-83.
- Genovez M.E., Oliveira J.C.F., Castro V., Ferrari C.I.L., Scarcelli E., Cardoso M.V., Paulin L.M. & Lança Neto P. 2004. Serological profile of a nelore herd presenting endemic leptospirosis and submitted to vaccination. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 71(4): 411-416. out/dez.
- Girio R.J.S. & Lemos R.A.A. 2002. Enfermidades da reprodução: Leptospirose. In: Lemos R.A.A., Barros N., Brum K.B. Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte – perguntas e respostas. Editora UFMS. Campo Grande. p.253-260.
- Girio R.J.S., Pereira F.L.G., Marchiori Filho M., Mathias L.A., Herreira R.C.P., Alessi A.C. & Girio T.M.S. 2004. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil: utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. Cienc. Rural. 34(1): 165-169.
- Gordis L. 1996. Epidemiology. W.B. Saunders Company. 277p.
- Guimarães M.C., Côrtes J.A., Vasconcellos S.A. & Ito F.H. 1983. 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. 7(4): 21-34.
- Haake D.A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiol. 146: 1491-1504.
- Heath S.E. & Johnson R. 1994. Leptospirosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 205: 1518-1523.
- Heinemann M.B., Garcia J.F., Nunes C.M., Gregori F., Higa Z.M., Vasconcellos S.A. & Richtzenhain L.J. 2000. Detection and differentiation

of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.* 73(4): 261-267.

Holt S.C. 1978. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.* 42: 114-160.

Homem V.S.F., Heinemann M.B., Moraes Z.M., Vasconcellos S.A., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2001. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(2): 173-180.

Hunter P. 2005. Leptospirosis. In: Cortzer J.A.W. & Tustin R.C. *Infectious diseases of livestock*. Oxford, 2^a.ed. v.1. p.1445-1456.

Johnson R.C. & Rogers P. 1964. 5-fluorouracil as a selective agent for growth of leptospirae. *J. Bacteriol.* 87(2): 422-426.

Joseph R., Holt S.C. & Canale-Parola E. 1973. Peptidoglycan of free-living anaerobic spirochetes. *J. Bacteriol.* 115: 426-435.

Langoni H., Meireles L.R., Gottschalk S., Cabral K.G. & Silva A.V. 2000. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 67(1): jan/jun.

Lemos R.A.A. & Almeida A.P.M.G. 2005. Leptospirose bovina. In: Lemos R.A.A. *Leptospirose bovina, campilobacteriose genital bovina, tricomonose bovina, neosporose em bovinos*. Campo Grande, MS: Ed.UFMS.

Levett P.N. 2004. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? *Clin. Applied Immun. Reviews.* 4: 435-448.

Lilenbaum W. 1996. Atualização em leptospiroses bovinas. *Rev. Bras. Med. Vet.* 18(1): 9-13.

Lilenbaum W. & Souza G.N. 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 75: 249-251.

Madruga C.R., Aycardi E. & Putt N. 1980. Freqüência de aglutininas anti-leptospira em bovinos de corte na região Sul de Cerrado do estado de Mato Grosso. *Arq. Esc. Vet. UFMG.* 32(2): 245-249.

Marinho M., Langoni H., Oliveira S.L., Carreira R., Perri S.H.V. & Luvizoto M.C. 2003. Humoral immune response, bacterial recovery and time

lesions in mice genetically selected for high and low antibody production and in outbreed Balb/c mice face to *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae. Pesq. Vet. Bras. 23(1): 5-12.

- Martin S.W., Meek A.H. & Willeberg P. 1987. Veterinary Epidemiology: Principles and Methods. Iowa State University Press. 343p.
- Martin S.W., Shoukri M. & Thorburn M.A. 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. Prev. Vet. Med. 14: 33-43.
- Miller D.A., Wilson M.A. & Beran G.W. 1991. Relationships between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic, and seasonal factors. Am. J. Vet. Res. 52(11): 1766-1768.
- Miraglia F., Morais Z.M., Cortez A., Melville P.A., Marvullo M.F.V., Richtzenhain L.J., Visintin J.A. & Vasconcellos A.S. 2003. Comparison of four antibiotics for inactivating leptospire in bull semen diluted in egg yolk extender and experimentally inoculated with *Leptospira santarosai* serovar guaricura. Braz. J. Microbiol. 34: 147-151.
- Mitchison M., Bulach D.M., Vinh T., Rajakurmar K., Faine S. & Adler B. 1997. Identification and characterization of dTDP-rhaminose biosynthesis and transfer genes of lipopolysaccharide related rfb locus in *Leptospira interrogans* sorovar copenhageni. J. Bacteriol. 179: 1262-1271.
- Naiman B.M., Alt D., Bolin C.A., Zuerner R. & Baldwin C.I. 2001. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent th1 immunity comprising responses by cd4 and t lymphocytes. Infect. Immun. 69(12): 7550-7558.
- Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van Der Hoofd C.M., Graaf E.A.M. 1997. Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology. Wageningen Pers, Wageningen. 445p.
- OIE. 2006. World organisation for animal health. Leptospirosis. Chapter 2.2.4. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm. Acesso em 06/01/2006.
- Oliveira A.A.F., Mota R.A., Pereira G.C., Langoni H., Souza M.I., Navegantes W.A. & Sa M.E.R. 2001. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns municipal district, Pernambuco State, Brazil. Onderstepoort J. Vet. Res. 68: 275-279.
- Pearson J., Mackie D. & Ellis W. 1980. Milk drop syndrome resulting from *Leptospira hardjo*. Vet. Rec. 106: 135-136.

- Pellegrin A.O., Guimarães P.H.S., Sereno J.R.B., Figueiredo J.P., Lage A.P., Moreira E.C. & Leite R.C. 1999. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. Embrapa Pantanal: comunicado técnico 22: 1-9.
- Pereira M.G. 1995. Epidemiologia: Teoria e Prática. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 596p.
- Prescott J.F., Ferrier R.L., Nicholson V.M., Johnston K.M. & Hoff B. 1991. Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. Can. Vet. J. 32: 481-486.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. Veterinary Medicine, - A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses 9^a ed. Saunders Ltd. Title. 1880p.
- Richtzenhain L.J., Cortez A., Heinemann M.B., Soares R.M., Sakamoto S.M., Vasconcellos S.A., Morais Z.M., Scarcelli E., Genovez M.E. 2002. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. Vet. Microbiol. 87: 139-147.
- Rumel D. 1986. "Odds Ratio": Algumas Considerações. Rev. Saúde Pub., São Paulo. 20(3): 253-258.
- Salles R.S. & Linlenbaum W. 2000. Leptospirose bovina no Brasil. Revista CFMV: suplemento técnico 20. mai/jun/jul/ago.
- Santa Rosa C.A., Castro A.F.P. & Troise C. 1961. Isolamento de *L. icterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo, Arq. Inst. Biol., São Paulo. 28: 113-118.
- Silva F.G., Freitas J.C., Anzai E.K., Hashimoto V.Y., Giraldi N., Delbem A.C.B., Bracarense A.P.F.R.L., Reis A.C.F. & Vasconcellos S.A. 2005. Leptospire detection in kidney, liver and uterus of cows slaughtered in Paraná State, Brazil. Braz. J. Microbiol. 36(1): 38-42.
- Sleight S.D. & Williams J.A. 1961. Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination of animals. A preliminary report. J. Am. Vet. Med. Assoc. 138: 151-152.
- Tabata R., Scanavini Neto H., Zuanaze M.A.F., Oliveira E.M.D., Dias R.A., Morais Z.M., Ito F.H. & Vasconcellos S.A. 2002. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup sejroe. Braz. J. Microbiol. 33: 267-270.

- Thiermann A.B. 1984. Leptospirosis: current developments and trends. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184(6): 722-725.
- Thrusfield M. 1995. *Veterinary Epidemiology*. 2^a ed. Blackwell Science. 479p.
- Tizard I.R. 2002. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. 6^a ed. Editora Rocca, São Paulo. 532p.
- Turner L.H. 1968. Leptospirosis II Serology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62: 880-899.
- Turner L.H. 1967. Special Article. Leptospirosis I. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61(6): 842-855.
- Vasconcellos S.A. 1993. Leptospirose Animal. Encontro Nacional em leptospirose, 3. Rio de Janeiro. 62-66.
- Vasconcellos S.A. 1997. Leptospirose. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 59(1): 29-32.
- Vasconcellos S.A. 1987. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.* 11(1): 17-24.
- Wang B., Sullivan J.A. & Sullivan G.W. 1984. Role of specific antibody in interaction of leptospiras with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 46: 809-813.

ARTIGO

Prevalência, variantes sorológicas e fatores de risco da leptospirose bovina em rebanhos de Mato Grosso do Sul, Brasil¹

Aline de O. Figueiredo²/*, Aiesca O. Pellegrin³, Vitor S.P. Gonçalves⁴, Emanuel B. Freitas⁵, Letícia Almeida R. C. Monteiro⁵, Jacqueline M. de Oliveira⁵ e Ana Luiza A. R. Osório⁶

ABSTRACT.- Figueiredo A.O., Pellegrin, A.O., Gonçalves, V.S.P., Freitas, E.B., Monteiro L.A.R.C., Oliveira J.M. & Osório A.L.A.R. 2008. [**Prevalence, serological variants, and factors of risk of bovine leptospirosis in herds in Mato Grosso do Sul, Brazil**]. Pesquisa Veterinária Brasileira XX (X): XXX-XXX. Programa Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil. E-mail: line_figueiredo@yahoo.com.br

The prevalence of anti-*Leptospira* sp. antibodies was investigated in female cattle aged 24 months and older from 178 herds in 22 counties in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. A total of 2,573 blood serum samples were tested against 10 leptospira serovars using the microagglutination test (MAT). Titers of 100 or higher for one or more serovars were detected in 1,801 females (98.8%) from 161 herds (85.2%). Serovar *hardjo* (65.6%) was implicated as the most likely one, followed by serovar *wolffi* (12.3%). The results demonstrate the presence of bovine leptospirosis in all the counties investigated, with a high prevalence both among animals and herds. In this

¹ Recebido em...

² Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO/MS), Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Cidade Universitária, Campo Grande, MS 79070-900.

³ Embrapa Pantanal, Corumbá, MS.

⁴ Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, DF.

⁵ Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO/MS).

⁶ Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS.

*Autor para correspondência. line_figueiredo@yahoo.com.br

particular investigation, beef-cattle raising and the Zebu breed were the risk factors found to be significant for herd infection by leptospiras.

INDEXING TERMS: Leptospirosis, bovines, epidemiology, herd

RESUMO.- Foi investigada a prevalência de anticorpos antileptospira em fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de 178 rebanhos de 22 municípios do Estado de Mato Grosso do Sul. Foram analisadas 2.573 amostras de soro sanguíneo por meio do teste de soroaglutinação microscópica perante 10 sorovares de leptospira. Títulos iguais ou superiores a 100 para um ou mais sorovares foram detectados em 1.801 fêmeas (98,8%) de 161 (85,2%) rebanhos. O sorovar hardjo (65,6%) foi apontado como o mais provável, seguido do sorovar wolffi (12,3%). Os resultados demonstram que a leptospirose bovina se encontra presente em todos os municípios estudados, com alta prevalência, tanto em animais como em rebanhos. No caso particular deste estudo, os fatores de risco significantes para infecção dos rebanhos por leptospiras foram o tipo de exploração pecuária de corte e a raça Zebu.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leptospirose, bovinos, epidemiologia, rebanho

INTRODUÇÃO

A leptospirose já foi diagnosticada em todos os continentes, exceto nas regiões polares, e em quase todos os países do mundo (Blaha 1995). A enfermidade tem alta prevalência em países de clima tropical, em decorrência das grandes precipitações e do tipo de solo ser neutro ou alcalino (Acha & Szyfres 1986).

No Brasil, a soroprevalência da leptospirose em rebanhos varia de 74% a 100% (Homem et al. 2001, Favero et al. 2001), e em animais de 45,56% a 62,3% (Langoni et al. 2000, Favero et al. 2001). Os inquéritos sorológicos

realizados em populações bovinas, no território brasileiro, evidenciam como importantes os sorovares hardjo, wolffi, pomona, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae e canicola, sendo mais prevalente o sorovar hardjo (Favero et al. 2001, Lilenbaum & Souza 2003, Araújo et al. 2005). No Mato Grosso do Sul, este mesmo sorovar também se destaca por ser o mais frequente (Madruga et al. 1980, Pellegrin et al. 1999, Favero et al. 2001).

Este estudo pretendeu investigar a prevalência de anticorpos antileptospira em fêmeas bovinas de rebanhos de uma região do Mato Grosso do Sul; identificar quais os sorovares predominantes na mesma região e quais as possíveis variáveis de risco que estão associadas com a presença da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

A investigação foi realizada numa região do estado de Mato Grosso do Sul (MS) composta de 22 municípios, que constitui uma área de 70.215 km², o que representa 19,7% do MS (Brasil 2002). Esses municípios fazem parte de três das quatro mesorregiões do estado (Mesorregião do Centro Norte de MS; Mesorregião do Leste de MS e Mesorregião do Sudoeste de MS). Possuem propriedades de extensão variada, dedicadas à exploração pecuária de corte e/ou leite e algumas desenvolvem atividade agrícola. O rebanho bovino da região estudada é de aproximadamente 5,7 milhões de cabeças, com uma média de 321 cabeças por rebanho, sendo a maioria com aptidão produtiva de corte, correspondentes a 23,2% do rebanho total do estado (Brasil 2003), que em 2004 era de 24,715 milhões de bovinos (Brasil 2004).

Amostragem

Para calcular o tamanho da amostra destinada a estimar prevalência de rebanhos considerou-se o grau de confiança de 95% e o nível de precisão absoluta dos resultados de $\pm 5\%$ (Noordhuizen et al.1997). A prevalência esperada de rebanhos, utilizada no cálculo foi de 87%, com base nos

achados sorológicos de Favero et al. (2001), em rebanhos de 21 Estados do Brasil. Assim, seria necessário amostrar 174 rebanhos de acordo com a fórmula padrão para amostragem aleatória simples (Thrusfield 1995, Noordhuizen et al. 1997), porém foi possível amostrar 178 rebanhos.

No sorteio das propriedades foi utilizada a listagem das fichas sanitárias fornecidas pela Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO) e para o cálculo do intervalo amostral dividiu-se o número total de propriedades pelo número de propriedades a serem amostradas. Nas propriedades rurais onde claramente foram identificados mais de um rebanho, escolheu-se como alvo do estudo o rebanho bovino de maior importância econômica, no qual os animais estavam submetidos ao mesmo manejo. Se uma propriedade sorteada não pôde, por quaisquer motivos, ser visitada, foi substituída por uma outra, nas proximidades e com as mesmas características de produção.

Após o sorteio das propriedades procedeu-se ao sorteio dos animais, utilizando o programa Herdacc®, com o qual foram simulados vários tamanhos de amostra de animais, assumindo diversos cenários de prevalência de animais soropositivos dentro do rebanho. Os valores de prevalência simulados foram 0%, 50%, 70%, 80%, 85% e 90% (Tabela 1), considerando 300 animais como tamanho de rebanho. Assim, em cada propriedade sorteada, foram amostradas 14 fêmeas, para obtenção das máximas sensibilidade e especificidade de rebanho, ou todas as fêmeas dessa faixa etária, se elas fossem menos do que 14. Sempre que possível foi coletado um número maior de amostras como medida de segurança, no caso de perdas que porventura ocorressem no transporte das mesmas.

Tabela 1- Especificidade e sensibilidade de rebanhos com tamanho médio de 300 animais considerando como ponto de corte 4 (quatro) animais positivos (assumindo uma distribuição hipergeométrica: cálculos realizados com assistência do software Herdacc®).

Tamanho da amostra	Especificidade de rebanho (%)	Sensibilidade de rebanho (%)				
		P = 0%	P = 50%	P=70%	P= 80%	P = 85%
8	100,0	46,0	80,3	91,2	94,5	97,0
10	100,0	67,8	93,5	98,1	99,1	99,6
12	100,0	82,6	98,1	99,6	99,9	100,0
14	100,0	91,3	99,5	99,9	100,0	100,0
16	99,9	95,9	99,9	100,0	100,0	100,0
18	99,9	98,2	100,0	100,0	100,0	100,0
20	99,9	99,2	100,0	100,0	100,0	100,0

P: prevalência

Assumindo que a sensibilidade do teste é 0,82 e a especificidade 0,97 (Cumberland et al. 1999).

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, consultando uma tabela de números aleatórios; nos casos em que o resultado era superior a dois, foi empregado o método de amostragem aleatória sistemática. No total, foram amostradas 2.573 fêmeas.

Obtenção das amostras

As amostras foram colhidas no período de dezembro de 2003 a março de 2004 e transportadas para o Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais (LADDAN), da IAGRO. Os soros obtidos foram estocados a -20°C e, depois, submetidos ao teste de diagnóstico de leptospirose.

Teste diagnóstico

Para o diagnóstico foi empregado o teste de soroaglutinação microscópica (SAM), utilizando uma coleção de antígenos vivos composta de 10

sorovares: icterohaemorrhagiae, copenhageni, canicola, autumnalis, pomona, grippotyphosa, hebdomadis, wolffi, bratislava e hardjo. Foram consideradas reagentes as amostras com título igual ou superior a 100, com 50% de aglutinação ou desaparecimento das células do campo, em microscopia de campo escuro (Brasil 1995). Os soros reagentes foram titulados em séries geométricas de quatro diluições de razão dois, sendo o título dado como a recíproca da maior diluição em que houve aglutinação.

Para efeito do cálculo de prevalência considerou-se qualquer animal reagente para um ou mais sorovares. Para a determinação dos sorovares predominantes considerou aqueles de maior título, e os animais que apresentaram dois ou mais sorovares com títulos idênticos foram excluídos dessa análise. No entanto estes animais foram computados como reatores para pelo menos um sorovar na proporção de animais examinados.

Banco de dados

O resultado do teste de diagnóstico e as informações do questionário aplicado em cada propriedade foram armazenados em um banco de dados, utilizando o programa Microsoft Access®.

Análise estatística

Prevalência de animais infectados

As prevalências aparentes simples (Pas), ponderada (Pap) e a prevalência real (Pr) para animais foram calculadas conforme Noordhuizen et al. (1997) e Bennett et al. (1991). Os valores de Pr foram estimados ajustando-se o valor da Pas e Pap para a especificidade (0,97) e sensibilidade (0,82) do teste de SAM (Cumberland et al. 1999).

Pas = n/N; onde:

n = número de animais positivos no teste SAM

N = número total de animais testados

$Pap = \sum w_i y_i / \sum w_i x_i$; onde:

w = fator de ponderação, ou seja, o peso que cada propriedade tem em número de animais em relação ao total de propriedades

x = número de animais testados por rebanho

y = número de animais positivos

i = número de cada rebanho

$Pr = (Pa + Esp-1) / (Sen + Esp-1)$; onde:

Sen = sensibilidade do teste

Pa = prevalência aparente

Esp= especificidade do teste

Prevalência de rebanhos infectados

A prevalência aparente de rebanho (PaR) (Martin et al. 1987) foi estimada por meio da seguinte fórmula:

$PaR = n/N$; onde:

n = número de rebanhos classificados como positivos

N = número total de rebanhos testados

Calculou-se a prevalência real de rebanho (PrR) de acordo com Martin et al. (1992), utilizando a seguinte fórmula:

$PrR = (PaR + EspR-1) / (SenR + EspR-1)$; onde:

PrR = prevalência real de rebanho

PaR = prevalência aparente de rebanho

EspR = especificidade de rebanho

SenR = sensibilidade de rebanho

Os intervalos de confiança (IC) das prevalências aparente e real de animais e de rebanhos foram calculados para uma confiança de 95%, conforme Martin et al. (1987), por meio da seguinte fórmula:

$IC = \text{valor estatístico} \pm (z * EP)$; onde:

z = 1,96 (Sampaio 1998)

EP = erro-padrão

Para o cálculo do erro padrão da prevalência de animais foi utilizada a fórmula abaixo, assumindo-se que a amostragem de animais foi do tipo conglomerado (Bennett et al. 1991):

EPconglomerado = $(C/\sum w_i x_i) * \sqrt{\{[(\sum w_i^2 y_i^2) - (2Pa\sum w_i^2 x_i y_i) + (Pa^2 \sum w_i^2 x_i^2)]/[C*(C-1)]\}}$;
onde:

C = número do conglomerados, ou seja, o número de rebanhos examinados

i = número de cada rebanho dentro da amostra C

w = fator de ponderação, ou seja, o peso relativo de cada conglomerado dentro da área de estudo

x = número de animais testados por propriedade

y = número de animais positivos ao teste

Pa = prevalência aparente ponderada de animais

O erro padrão da prevalência de rebanhos é calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

EP Pa rebanho = $\sqrt{Pa \text{ rebanho} * (1 - Pa \text{ rebanho}) / \text{total de propriedades examinadas}}$

Estimativa da sensibilidade e especificidade de rebanho

A SenR e EspR foram estimadas de acordo com Noordhuizen et al. (1997). Considerou-se o ponto de corte igual a quatro, significando que o achado de pelo menos 4 animais positivos no rebanho o classificava como rebanho positivo.

SenR = 1 - (1 - Pa)ⁿ, onde

Pa = prevalência aparente

1 - Pa = a probabilidade de testar um animal e este resultar negativo

(1 - Pa)ⁿ = a probabilidade de testar os “n” animais e todos serem negativos

ⁿ = número de animais testados por propriedade

EspR = Espⁿ, onde:

Esp = especificidade

ⁿ = número de animais testados por propriedade

Para o cálculo da SenR e EspR utilizou-se como n a média aritmética (n=14) do número de animais testados nos 178 rebanhos.

Valores preditivos

O valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) do diagnóstico do rebanho foram estimados de acordo com Noordhuizen et al. (1997), por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{VPP} = [\text{PrR} * \text{SenR}] / [[(\text{PrR} * \text{SenR}) + (1 - \text{PrR})] * (1 - \text{EspR})]$$

$$\text{VPN} = [(1 - \text{PrR}) * \text{EspR}] / [[\text{PrR} * (1 - \text{SenR})] + [(1 - \text{PrR}) * \text{EspR}]];$$

onde:

PrR = prevalência real de rebanho

SenR = sensibilidade de rebanho

EspR = especificidade de rebanho

Questionário e análise dos fatores de risco

Foi aplicado um questionário aos proprietários ou responsáveis pelos rebanhos, no qual foram incluídas informações do tipo de exploração (corte, leite e misto), uso de inseminação artificial, raças predominantes, presença de outras espécies domésticas, compra e venda de animais, áreas alagadiças e presença de aborto. Para o estrato foi realizado estudo de fatores de risco do tipo transversal. Para tanto foram formados dois grupos de propriedades – positivas e negativas – que, quando comparados entre si quanto às variáveis pesquisadas no questionário epidemiológico, permitiu medir a força da associação dessas variáveis com a presença da leptospirose.

As variáveis de risco associadas à soropositividade do rebanho para pelo menos um sorovar foram analisadas por meio da estimativa intervalar da *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%. Já quando a frequência de propriedades apresentou-se menor que cinco, o cálculo de associação entre as variáveis foi realizado por meio do Teste Exato de Fisher.

RESULTADOS

De acordo com o questionário obteve-se que das 178 propriedades, 71 eram destinadas à exploração de corte, 81 leiteira e 26 de criação mista. Das propriedades amostradas, constatou-se que em nenhuma delas havia orientação para vacinação antileptospirose.

A Tabela 2 apresenta os resultados do teste de SAM em rebanhos e animais amostrados nos diferentes municípios da área de estudo.

Tabela 2 - Frequência de leptospirose bovina, em rebanhos e animais, obtida por meio do teste de soroaglutinação microscópica.

Municípios	Rebanhos			Animais		
	Examinados	Positivos	Freq.(%)	Examinados	Positivos	Freq. (%)
Angélica	4	3	75,0%	49	20	40,8%
Bandeirantes	7	7	100,0%	121	97	80,2%
Caarapó	7	7	100,0%	113	70	61,9%
Campo Grande	15	15	100,0%	208	162	77,9%
Deodápolis	8	7	87,5%	97	68	70,1%
Douradina	2	1	50,0%	22	9	40,9%
Dourados	16	13	81,3%	201	145	72,1%
Fátima do Sul	4	3	75,0%	43	23	53,5%
Glória de Dourados	9	9	100,0%	120	82	68,3%
Itaporã	6	6	100,0%	74	49	66,2%
Ivinhema	13	11	84,6%	166	83	50,0%
Jaraguari	7	7	100,0%	91	76	83,5%
Jateí	7	6	85,7%	102	68	66,7%
Maracaju	5	5	100,0%	83	78	94,0%
Nova Alvorada do Sul	8	8	100,0%	160	129	80,6%
Novo Horizonte do Sul	10	9	90,0%	158	96	60,8%
Ribas do Rio Pardo	17	13	76,5%	266	141	53,0%
Rio Brilhante	6	6	100,0%	88	67	76,1%
Rochedo	5	5	100,0%	90	83	92,2%
Sidrolândia	8	7	87,5%	88	64	72,7%
Terenos	10	10	100,0%	172	158	91,9%
Vicentina	4	3	75,0%	61	33	54,1%
Total	178	161	90,4%	2573	1801	70,0%

A Figura 1 ilustra o percentual de reações por sorovar na área estudada, considerando apenas os reagentes mais prováveis, analisados por meio do teste SAM, com ponto de corte igual ao título de 100.

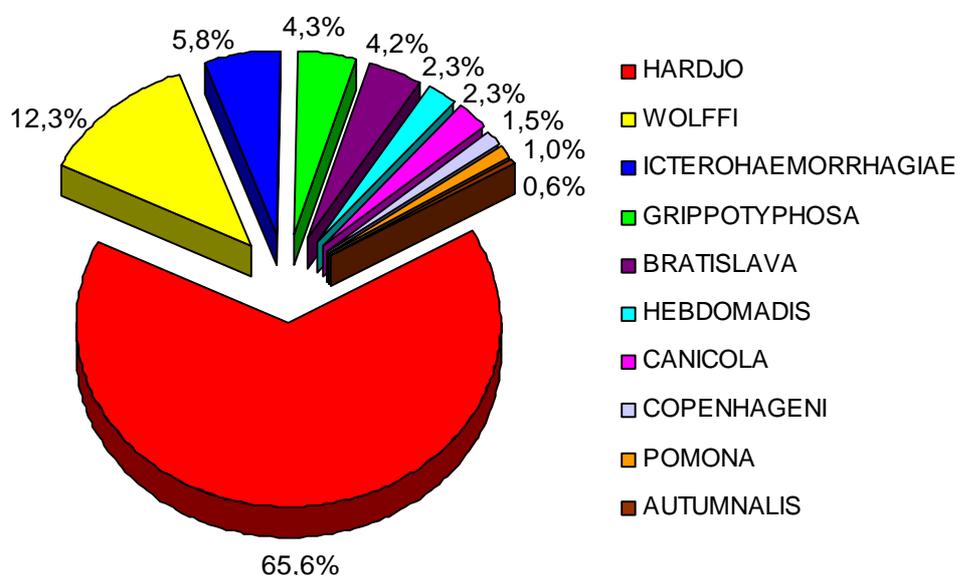


Figura 1- Percentual de amostras reagentes, segundo os sorovares mais prováveis, analisadas por meio do teste de soroaglutinação microscópica. n=1.380 (total de reações mais prováveis)

A Tabela 3 registra os resultados de prevalência aparente, sensibilidade e especificidade de rebanho, prevalência real e valores preditivos de leptospirose bovina em rebanhos. Na Tabela 4 observa-se os valores de prevalência aparente simples, ponderada e prevalência real ponderada de leptospirose bovina em animais, na área estudada no estado de Mato Grosso do Sul.

Tabela 3- Prevalência aparente, intervalo de confiança, sensibilidade e especificidade de rebanho, prevalência real e valores preditivos de leptospirose bovina em rebanhos.

PaR	IC inferior PaR	IC superior PaR	SenR	EspR	PrR	IC inferior PrR	IC inferior PrR	VPP	VPN
90,4%	85,8%	95,1%	100%	64,4%	85,2%	80,1%	90,2%	94,1%	100%

PaR: prevalência aparente de rebanhos;

IC: intervalo de confiança;

SenR: sensibilidade de rebanho;

EspR: especificidade de rebanho;

PrR: prevalência real de rebanho;

VPP: valor preditivo positivo;

VPN: valor preditivo negativo.

Tabela 4 – Prevalência aparente simples, ponderada, intervalo de confiança e prevalência real de leptospirose bovina em animais.

Pas	Pap	IC inferior Pap	IC superior Pap	Pr pond.
70,0%	81,1%	76,3%	85,9%	98,8%

Pas: a prevalência aparente simples;

Pap: prevalência aparente ponderada;

Pr: obtida com base na correção da Pap para sensibilidade e especificidade do teste;

IC: intervalo de confiança.

As análises das variáveis de risco associadas a soropositividade dos rebanhos para pelo menos um sorovar, por meio da análise intervalar da *odds ratio*, identificaram como fatores de risco as variáveis raça (zebu) e tipo de exploração (corte) (Tabela 5).

Tabela 5 – Variáveis de risco para leptospirose nos rebanhos considerando as reações para pelo menos um sorovar, com os correspondentes valores de odds ratio (OR).

Variáveis	Descrição	Positivos	Negativos	OR	IC ^a inferior	IC superior
Exploração	Corte	70	1			
	Leite	69	12	12,17*	2,23	64,46
	Corte	70	1			
	Mista	22	4	12,73**	2,07	78,35
	Leite	69	12			
	Mista	22	4	1,05	0,30	3,59
Aborto	Sim	64	5			
	Não	97	12	1,58	0,53	4,69
Ingresso de animais	Compra animais	72	6			
	Não compra animais	89	11	1,48	0,52	4,20
Fonte de contaminação	Existe área alagadiça	119	13			
	Não existe	42	4	0,87	0,27	2,83
Reprodução	Touro	142	16			
	Inseminação artificial e touro	15	1	0,59	0,07	4,70
Suínos	Sim	91	12			
	Não	70	5	0,54	0,18	1,59
Raça	Zebu	67	1			
	Mestiço	68	12	11,82*	2,21	63,21
	Zebu	67	1			
	Europeu de leite	19	4	14,11**	2,33	85,40
	Mestiço	68	12			
	Europeu de leite	19	4	1,19	0,34	4,15

^a IC (intervalo de confiança) 95%

* Teste de χ^2 ; $p < 0,05$.

** Teste Exato de Fisher; $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Rebanhos e animais sororreagentes para leptospirose bovina foram constatados nos 22 municípios estudados (Tabela 2). 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, embora os municípios sejam diferentes dos deste estudo.

A prevalência aparente de 90,4% (85,8%-95,1%) da leptospirose bovina dos rebanhos estudados (Tabela 3) assemelha-se as encontradas por Homem et al. (2001) no município de Uruará, Pará, de 97% (90,9%–99,5%) e por Aguiar et al. (2006), no município de Monte Negro, Rondônia, de 95,3%

(88,5%–98,7%). No município de Garanhuns, estado do Pernambuco, Oliveira et al. (2001) testaram rebanhos leiteiros e encontraram pelo menos um animal sororreagente em todas as propriedades analisadas. Também em rebanhos leiteiros, no estado do Rio de Janeiro, Lilenbaum & Santos (1995) constataram prevalência de 80,95%. Em estudo realizado por Favero et al. (2001) em 21 estados brasileiros, a prevalência de propriedades com pelo menos um animal positivo foi de 84,1%, com valores variando entre 74% e 100%, incluindo rebanhos positivos em todos os estados analisados. Cabe lembrar, que neste estudo houve maior rigor para classificar a propriedade como positiva, ao definir o ponto de corte igual a quatro.

Em animais, a prevalência aparente ponderada obtida de 81,1% (Tabela 4) foi superior a encontrada no estudo de Favero et al. (2001) nos 21 estados brasileiros, onde uma proporção de 62,3% de animais reagentes foi observada. Da mesma forma, os estudos de Langoni et al. (2000) em bovinos provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo, de Oliveira et al. (2001) e de Aguiar et al (2006), registraram 45,56%, 47,63% e 52,8% de prevalências, respectivamente. Cabe ressaltar, que neste estudo, as imperfeições dos testes de diagnóstico foram corrigidas quando se calculou a prevalência real de animais (98,8%), o que aumentou ainda mais a prevalência.

Na região Centro-Oeste, estudos realizados por Juliano et al. (2000), em bovinos leiteiros na microrregião de Goiânia, GO, e por Madruga et al. (1980) em bovinos de corte no estado de Mato Grosso, revelaram prevalência em animais de 81,9% e 74,5%, respectivamente, semelhantes a obtida neste estudo (Tabela 4).

Os achados deste estudo, de elevada soroprevalência para leptospirose bovina em animais e rebanhos, concordante com a maioria de outros estudos no país, estão relacionados ao grau de disseminação regional da infecção, pois valores elevados significam que as oportunidades de transmissão estão presentes em todo o Brasil.

Neste estudo, os sorovares hardjo (65,6%) e wolffi (12,3%) (Figura 1), embora com prevalências distintas, concordam quanto à predominância com

os achados de Favero et al. (2001), em levantamento realizado em 21 estados brasileiros, onde encontraram 51,5% de hardjo e 24,2% de wolffi; e de Lilenbaum & Souza (2003), no Rio de Janeiro, onde obtiveram 43,8% de hardjo e 24,7% de wolffi. Em Minas Gerais, Araújo et al. (2005) encontraram 19,7% de hardjo e 13,2% de wolffi. No estado da Paraíba (Lage et al. 2007), o sorovar hardjo foi o mais freqüente com 16,05% das reações positivas.

Da mesma forma, os resultados encontrados confirmam achados anteriores em levantamentos realizados por Pellegrin et al. (1992), Pellegrin & Sereno (1994) e Pellegrin et al. (1999) na região do Pantanal Sul-matogrossense, onde o sorovar hardjo foi o mais observado, seguido pelo sorovar wolffi. No estudo de Langoni et al. (2000), em SP, os mesmos sorovares foram encontrados como prevalentes, porém o sorovar wolffi foi o mais freqüente (70,59%) seguido do hardjo (67,57%). Já Homem et al. (2001), em Uruará, encontraram o sorovar hardjo (61,2%) e bratislava (9%) como prevalentes, assim como Oliveira et al. (2001), em Pernambuco, onde hardjo representou 21,98% das reações e bratislava 15,73%. Na microrregião de Goiânia, GO, Juliano et al. (2000) encontraram o sorovar wolffi (36,1%) como o mais prevalente, seguido dos sorovares icterohaemorrhagiae (20,50%) e hardjo (5,2%).

Neste estudo, embora haja predominância dos sorovares hardjo e wolffi, também relatada por outros pesquisadores em gado de corte e leite, não deve ser descartada a possibilidade de reação cruzada no sorodiagnóstico, pois ambos os sorovares pertencem ao sorogrupo sejrøe (Costa et al. 1998). Mesmo que tenha sido comprovada por sorodiagnóstico a existência do sorovar wolffi, a patogenicidade deste não foi comprovada em bovinos, tendo sido experimentalmente verificada em ovinos (Batra et al. 1991).

Títulos positivos para o sorovar hardjo já foram encontrados em bovinos de diversos países, tais como Canadá (Prescott et al. 1988), Estados Unidos (Miller et al. 1991), Espanha (Alonso-Andicoberry et al. 2001) e México (Cervantes et al. 2002) e tem sido o causador mais freqüente de infecções entre os rebanhos do mundo todo, inclusive no Brasil (Vasconcellos et al. 1997, Favero et al. 2001).

Dentre os sorovares mais prováveis (dados não mostrados), o hardjo foi o mais prevalente nos rebanhos de 21 dos 22 municípios amostrados, sendo Douradina, MS, o único a apresentar o sorovar bratislava como o mais freqüente. Porém, não significa que reações para o sorovar hardjo não ocorreram, pois em decorrência do critério para seleção dos sorovares mais prováveis tais reações foram excluídas (Favero et al. 2001). A predominância de reações para o sorovar hardjo, neste estudo, reforça a teoria de que a espécie bovina é o hospedeiro preferencial para esse sorovar (Ellis 1994, Pellegrin et al. 1999), e que sua expansão ocorre por causa de fatores ambientais ligados ao manejo (Faine 1982).

A identificação do sorovar hardjo como predominante nos rebanhos, indica que estão presentes os mecanismos de transmissão de bovino a bovino. Assim, conforme Lilenbaum (1996), três medidas podem ser praticadas simultaneamente: evitar a introdução de animais no rebanho, salvo quando negativos ao sorodiagnóstico ou previamente tratados com dihidroestretomicina; tratar os animais sororreagentes do rebanho com dihidroestretomicina; fortalecimento da imunidade utilizando uma vacina que contenha as principais variedades presentes na região.

Embora baixa, a prevalência obtida para o sorovar pomona (Figura 1) deve ser considerada, pois a soropositividade para esse sorovar quando presente pode induzir ao aborto em bovinos. Nessa espécie, título alto é comumente achado no momento do aborto, porque a incidência clínica ocorre durante a fase aguda da infecção. Ao contrário, para o sorovar hardjo a resposta sorológica no aborto é mais variável, com alguns animais soronegativos e outros mostrando altos títulos (OIE 2006).

O valor preditivo positivo (94,1%) (Tabela 3) obtido no estrato estudado indica que a maioria os rebanhos diagnosticados como positivos pelo teste têm leptospirose. Dos rebanhos classificados como negativos, em decorrência do alto valor preditivo negativo (100%) (Tabela 3), pode-se dizer que estes estão livres da doença (Noordhuizen et al. 1997).

As análises das variáveis associadas a soropositividade dos rebanhos para pelo menos um sorovar identificaram como fatores de risco o tipo de

exploração e a raça. Rebanhos provenientes de exploração do tipo corte (Tabela 5) têm 12,17 vezes mais chances de apresentarem infecção para pelo menos um sorovar, quando comparados com o tipo leite ou com exploração mista (OR=12,73). Vasconcellos et al. (1997) examinando rebanhos leiteiros e de corte, em seis estados brasileiros, observaram uma proporção mais elevada de soropositividade para leptospirose entre os bovinos de corte. Os rebanhos provenientes de animais da raça Zebu (Tabela 5) têm mais chances de apresentarem infecção para pelo menos um sorovar quando comparados aos mestiços (OR=11,82) e europeu de leite (OR=14,11). Neste estudo, provavelmente, a contaminação se deve a mecanismos de transmissão da leptospirose de bovino a bovino nos rebanhos de pecuária de corte da raça Zebu.

As demais variáveis não apresentaram associação, possivelmente, em decorrência das elevadas proporções de rebanhos reagentes, que impossibilitaram a fixação de grupos controle que incluíssem um número suficiente de rebanhos negativos.

Contrariamente a este estudo, algumas variáveis relacionadas com o manejo são comumente identificadas como possíveis de aumentar o risco de infecção do rebanho pelo sorovar hardjo, como: bovinos e ovinos coabitando o mesmo pasto (Lilenbaum & Souza 2003); acesso de bovinos a fontes de água contaminada, como riachos, rios, alagamentos ou drenagem de água (Bennett 1993, Hunter 2005), além da movimentação de animais (Faine 1982). Tais discrepâncias podem ser explicadas pela alta prevalência obtida neste estudo, no qual se observou que a doença está presente independentemente das variáveis de risco relacionadas com as características de produção e manejo dos animais.

A leptospirose bovina encontra-se presente em todos os municípios estudados, observando-se alta prevalência tanto em animais como em rebanhos. Apesar do sorovar hardjo ser o mais prevalente, não é o único a circular 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. 1986. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Parte I: Bacteriosis - Leptospirosis. 2a edicion. Organization Mundial de la Salud, Genova. p.112-119.
- Aguiar D.M., Gennari S.M., Cavalcante G.T., Labruna M.B., Vasconcellos S.A., Rodrigues A.A.R., Moraes Z.M. & Camargo L.M.A. 2006. Seroprevalence of *Leptospira* spp in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. *Pesq. Vet. Bras.* 26(2): 102-104.
- Alonso-Andicoberry C., García-Peña F.J., Pereira-Bueno J., Costas E. & Ortega-Mora L.M. 2001. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Prev. Vet. Med.* 52: 109-117.
- Araújo V.E.M., Moreira E.C., Navega L.A.B., Silva J.A. & Contreras R.L. 2005. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sangüíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arq. BrasBras. Med. Vet. Zootec.* 57(4): 430-435.
- Batra H., Chandidramani N.K. & Mandokhot U.V. 1991. Clinical, bacteriological, serological, pathological and metabolic studies of *Leptospira interrogans* serovar wolffi infection in sheep. *Indian J. Anim. Sci.* 61(1): 6-12.
- Bennett R.M. 1993. Decision support models of leptospirosis in dairy herds. *Vet. Rec.* 132(3): 59-61.
- Bennett S, Woods T, Liyanage WM et al. 1991. A simplified general method for cluster sample surveys of health in developing countries. *World Health Statistics Quartely.* 44(3): 98-106.
- Blaha T. 1995. *Epidemiología Especial Veterinaria*. 1ª ed. Editorial Acribia, S.A: Espanha. p.128-136.
- Brasil. 2004. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção da Pecuária Municipal - PPM, v.32.
- Brasil. 2003. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção da Pecuária Municipal - PPM, v.31.

- Brasil. 2002. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Resolução nº 05 de 10/10/2002.
- Brasil. 1995. Ministério da Saúde. Manual de Leptospirose. 2 ed. rev. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 98p.
- Cervantes L.P.M., Puebla M.A.C., Rosas D.G., Serranía N.R. & Barranca J.I.T. 2002. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. Rev. Cubana Med. Trop. 54(1): 24-27.
- Costa M.C.R., Moreira E.C., Leite R.C. & Martins N.R.S. 1998. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 50(1): 11-17.
- Cumberland P., Everard C.O.R. & Levett P.N. 1999. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(5): 731–734.
- Ellis W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10: 463-478.
- Faine S. 1982. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization, Geneva. 171p.
- Favero M., Pinheiro S.R., Vasconcellos S.A., Moraes Z.M., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2001. Leptospirose bovina - variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 68(2): 29-35. jul./dez.
- Homem V.S.F., Heinemann M.B., Moraes Z.M., Vasconcellos S.A., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2001. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34(2): 173-180.
- Hunter P. 2005. Leptospirosis. In: Cortzer J.A.W. & Tustin R.C. Infectious diseases of livestock. Oxford, 2ª.ed. v.1. p.1445-1456.
- Juliano R.S., Chaves N.S.T., Santos C.A., Ramos L.S., Santos H.Q., Meireles L.R., Gottschalk S. & Corrêa Filho R.A.C. 2000. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO. Ciênc. Rural. 30(5): 857-862.

- Lage A.P., Leite R.M.H., Thompson J.A., Bandeira D.A., Herrmann G.P., Moreira E.C., Gonçalves V.S.P. 2007. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba, Brazil. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 74(.3): 185-190. jul./set.
- Langoni H., Meireles L.R., Gottschalk S., Cabral K.G. & Silva A.V. 2000. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 67(1): jan/jun.
- Lilenbaum W. 1996. Atualização em leptospiroses bovinas. Rev. Bras. Med. Vet. 18(1): 9-13
- Lilenbaum W. & Santos M.R.C. 1995. Leptospirosis in animal reproduction: III. Role of the hardjo serovar in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Latinoam. Microbiol. 37(2): 87-92.
- Lilenbaum W. & Souza G.N. 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. Res. Vet. Sci. 75: 249-251.
- Madruga C.R., Aycardi E. & Putt N. 1980. Freqüência de aglutininas anti-leptospira em bovinos de corte na região Sul de Cerrado do estado de Mato Grosso. Arq. Esc. Vet. UFMG. 32(2): 245-249.
- Martin S.W., Meek A.H. & Willeberg P. 1987. Veterinary Epidemiology: Principles and Methods. Iowa State University Press. 343p.
- Martin S.W., Shoukri M. & Thorburn M.A. 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. Prev. Vet. Med. 14: 33-43.
- Miller D.A., Wilson M.A. & Beran G.W. 1991. Relationships between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic, and seasonal factors. Am. J. Vet. Res. 52(11): 1766-1768.
- Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van Der Hoofd C.M., Graaf E.A.M. 1997. Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology. Wageningen Pers, Wageningen. 445p.
- OIE. 2006. World organisation for animal health. Leptospirosis. Chapter 2.2.4. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm. Acesso em 06/01/2006.
- Oliveira A.A.F., Mota R.A., Pereira G.C., Langoni H., Souza M.I., Navegantes W.A. & Sa M.E.R. 2001. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns municipal district, Pernambuco State, Brazil. Onderstepoort J. Vet. Res. 68: 275-279.

- Pellegrin A.O., Sereno J.R.B. & Figueiredo J.O. 1992. Levantamento sorológico de aglutininas anti-leptospira em bovinos da sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul-matogrossense. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 22. Resumos, Curitiba.
- Pellegrin A.O. & Sereno J.R.B. 1994. 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. Resumos, Olinda, p.189.
- Pellegrin A.O., Guimarães P.H.S., Sereno J.R.B., Figueiredo J.P., Lage A.P., Moreira E.C. & Leite R.C. 1999. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. Embrapa Pantanal: comunicado técnico 22: 1-9.
- Prescott J.F., Miller R.B., Nicholson V.M., Martin S.W. & Lesnick T. 1988. Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. Can. J. Vet. Res. 52: 210-215.
- Sampaio I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEPMVZ. 221p.
- Thrusfield, M. 1995. Veterinary epidemiology. 2. ed. Cambridge: Blackwell Science. 479 p.
- Vasconcellos S.A., Barbarini Júnior O., Umehara O., Morais Z.M., Cortez A., Pinheiro S.R., Ferreira F., Fávero A.C.M. & Ferreira Neto J.S. 1997. 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. Arq. Inst. Biol. 64: 7-15.

APÊNDICE

APÊNDICE B

Total de reações aproveitadas e percentuais de sorovares mais prováveis.

Municípios	Nº de reações mais prováveis*	Sorovares mais prováveis										
		hardjo	wolffi	icterohaemorrhagiae	grippotyphosa	bratislava	copenhageni	canicola	hebdomadis	pomona	autumnalis	
Angélica	17	16	nr**	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	1
Bandeirantes	73	48	6	1	2	10	4	nr	2	nr	nr	nr
Caarapó	60	53	2	nr	1	nr	nr	2	nr	2	nr	nr
Campo Grande	111	64	17	11	4	11	4	nr	nr	nr	nr	nr
Deodápolis	57	43	2	7	1	nr	3	nr	nr	1	nr	nr
Douradina	3	nr	nr	nr	nr	3	nr	nr	nr	nr	nr	nr
Dourados	111	64	29	5	4	2	1	3	2	1	nr	nr
Fátima do Sul	16	14	nr	nr	nr	nr	nr	2	nr	nr	nr	nr
Glória de Dourados	43	5	10	1	2	6	1	12	5	1	nr	nr
Itaporã	39	24	1	9	nr	2	nr	2	nr	nr	nr	1
Ivinhema	70	40	12	4	1	nr	1	nr	11	1	nr	nr
Jaraguari	49	21	5	12	1	5	1	4	nr	nr	nr	nr
Jateí	58	44	7	nr	nr	2	nr	1	3	nr	nr	1
Maracaju	65	52	4	1	4	nr	nr	1	1	2	nr	nr
Nova Alvorada do Sul	114	77	15	6	nr	9	nr	2	nr	5	nr	nr
Novo Horizonte do Sul	77	44	18	6	2	1	1	1	4	nr	nr	nr
Ribas do Rio Pardo	110	83	19	1	1	2	1	2	nr	nr	nr	1
Rio Brillhante	56	41	5	4	1	2	1	nr	2	nr	nr	nr
Rochedo	57	38	12	6	1	nr						
Sidrolândia	37	25	5	5	nr	nr	nr	nr	1	nr	nr	1
Terenos	127	83	1	1	34	1	3	nr	1	1	nr	2
Vicentina	30	26	nr	nr	1	2	nr	nr	nr	nr	nr	1
Totais	1380	905	170	80	60	58	21	32	32	14	8	8
Percentuais***		65,58	12,32	5,80	4,35	4,20	1,52	2,32	2,32	1,01	0,58	0,58

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

** nr: não reagente

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