

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Centro de Desenvolvimento Tecnológico  
Curso de Graduação em Biotecnologia



## **Trabalho Acadêmico**

**Soroprevalência da leptospirose ovina na mesorregião  
Sudeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

**Carolina Ximendes dos Santos**

Pelotas, 2012

**CAROLINA XIMENDES DOS SANTOS**

**SOROPREVALÊNCIA DA LEPTOSPIROSE OVINA NA MESORREGIÃO  
SUDESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Trabalho Acadêmico apresentado  
ao Curso de Graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Federal de Pelotas como requisito  
parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Odir Antônio Dellagostin

Orientador de estágio: André Alex Grassmann

Pelotas, 2012

**Dados de catalogação na fonte:**  
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S237s Santos, Carolina Ximendes dos

Soroprevalência da leptospirose ovina na mesorregião sudeste do estado do Rio Grande do Sul / Carolina Ximendes dos Santos ; orientador acadêmico Odir Antônio Dellagostin ; orientador de estágio André Alex Grassmann. Pelotas, 2012. 54f.: il - Monografia (Conclusão de Curso em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Leptospirose 2.Ovinos 3.Epidemiologia 4.MAT  
5.Rio Grande do Sul I.Dellagostin, Odir Antônio  
(orientador) II.Grassmann, André Alex (orientador)  
III.Título.

**Banca examinadora:**

Dr. Éverton Fagonde da Silva

M.Sc. Samuel Rodrigues Félix

M.Sc. Sérgio Jorge

Dr. Odir Antônio Dellagostin (orientador)

### **Dedicatória**

Às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, cujo amor e dedicação possibilitaram minha formação pessoal e profissional; e meus irmãos, pelo incentivo, parceria e cumplicidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Cláudio e Lilian, base para que me tornasse quem sou hoje, pela presença fundamental, paciência, educação, carinho, incentivo, preocupação, conselhos, confiança, exemplos, valores, torcida, orientação, enfim, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Marcelo e Vinicius, pelo carinho, amor, amizade e companheirismo que me fortalece todos os dias.

Ao professor Odir Dellagostin, exemplo a ser seguido, pela orientação durante o período da graduação e na realização deste trabalho, contribuindo para meu crescimento profissional.

Ao professor Éverton Fagonde da Silva pela oportunidade de ingresso no estágio e grupo de pesquisa que muito me acrescentou nessa etapa.

Ao André Grassmann pela dedicação, atenção, paciência e amizade em me orientar no período de estágio e TCC.

Aos amigos de grupo de pesquisa pelos momentos de trabalho e diversão compartilhados. Em especial ao Samuel e ao Amilton pela disposição em sempre me esclarecer dúvidas e pela ajuda fundamental na realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Vacinologia pelos agradáveis anos de convívio, trabalho e descontração.

Aos meus amigos de graduação Carol, Fernando, Marrí, Suélen, Thaís e Victor pela amizade e pelos momentos vividos nesses quatro anos.

Aos demais colegas e professores do Centro de Biotecnologia pela agradável convivência e ensinamentos transmitidos.

A todos os familiares e amigos que tornam meus dias mais felizes.

**Meu carinho e gratidão!**

## RESUMO

Ximendes dos Santos, Carolina. **Soroprevalência da leptospirose ovina na mesorregião Sudeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2012. Monografia – Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma zoonose de importância devido aos prejuízos econômicos que acarreta à produção animal. Falhas na cadeia reprodutiva de ovinos, decorrentes da infecção por leptospirose, tem sido um obstáculo para a expansão da ovinocultura no Brasil. A pesquisa realizada buscou determinar a prevalência de ovinos reagentes para leptospirose, assim como os sorogrupos predominantes e alguns fatores de risco associados à ovinocultura em municípios da mesorregião Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Para isso, 847 amostras de sangue foram coletadas de animais procedentes de 92 propriedades distribuídas em 21 municípios do estado. Paralelamente, foi realizado um questionário epidemiológico, contendo informações que pudessem fornecer dados sobre a epidemiologia da leptospirose na região. A frequência de anticorpos anti-*Leptospira* nos rebanhos ovinos foi avaliada através do teste de aglutinação microscópica (MAT), que é o padrão-ouro para o diagnóstico da doença. Foi utilizada uma bateria de 5 sorogrupos de *Leptospira* spp. como antígenos no MAT. Dos animais analisados, 191 foram reagentes, com títulos variando de 100 a 400, o que representou uma prevalência de 22% da doença na região. Os resultados obtidos mostraram que a maior frequência de animais reagentes ocorreu com o sorogrupo Pomona, seguido dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Serjroe (sorovar Hardjo) e Canicola. As propriedades onde a alimentação dos animais era suplementada com sal mineral foram associadas a maiores índices de ovinos reagentes para leptospirose. Da mesma forma, positividade para o sorovar Hardjo parece estar relacionada com o destino incorreto de vísceras e carcaças dos animais e com presença de canídeos silvestres na propriedade. Já a positividade para o sorogrupo Canicola foi relacionada com a presença de suínos nas propriedades, além do destino inadequado de carcaças e vísceras. Os resultados mostraram que *Leptospira* spp. são agentes presentes entre os rebanhos ovinos da mesorregião Sudeste do Rio Grande do Sul.

**Palavras-chave:** Leptospirose, ovinos, epidemiologia, MAT, Rio Grande do Sul.

## ABSTRACT

Ximendes dos Santos, Carolina. **Seroprevalence of ovine leptospirosis in the Southeastern region of Rio Grande do Sul state, Brazil.** 2012. Monografia – Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a zoonosis of importance due to the economic losses that it causes to the production chain. Reproductive failures of sheep, resulting from leptospirosis infection has been an obstacle to the expansion of sheep production in Brazil. We conducted a survey to determine the prevalence of sheep seropositive for leptospirosis, as well as the prevalent serogroups and some risk factors associated with the sheep industry in Southeastern region of Rio Grande do Sul, Brazil. For this purpose, 847 blood samples were collected from animals of 92 properties distributed in 21 municipalities. In parallel, we performed an epidemiological questionnaire, containing information that could provide data on the epidemiology of leptospirosis in the region. The frequency of anti-*Leptospira* antibodies in sheep flocks was assessed by the microscopic agglutination test (MAT), which is the gold standard for diagnosis. We used a battery of five serogroups of *Leptospira* spp. as antigens in MAT. Of the animals tested, 191 were positive, with titres ranging from 100 to 400. The results showed that the highest frequency of seropositive animals occurred with serogroup Pomona, followed by serogroups Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Serjroe (Hardjo), Canicola. The properties where the animal feed was supplemented with mineral salt were associated with higher rates of sheep tested positive for leptospirosis. Similarly, positivity for serogroup Hardjo seems to be related to the incorrect destination of internal organs and carcasses of animals and the presence of wild dogs on the property. Positivity for serogroup Canicola was related to the presence of pigs on the property, in addition to the inappropriate destination of internal organs and carcasses. The results showed that *Leptospira* spp. are present among the flocks of sheep in Southeast of Rio Grande do Sul.

**Keywords:** Leptospirosis, sheep, epidemiology, MAT, Rio Grande do Sul.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa do estado do Rio Grande do Sul, com destaque para localização dos municípios que fizeram parte do estudo.....	37
Figura 2	Prevalência de animais positivos para leptospirose ovina considerando a população amostrada e as propriedades.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevalência de aglutininas anti- <i>Leptospira</i> spp. em 847 soros ovinos de 21 municípios da mesorregião Sudeste do Rio Grande do Sul.....	39
Tabela 2	Número e título de animais positivos para cada sorogrupo utilizado na triagem.....	40
Tabela 3	Número de sorogrupos reativos por animal positivo.....	41
Tabela 4	Características das propriedades incluídas no estudo que apresentam relação com soropositividade para leptospirose ou algum sorogrupo.....	42

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO.....	12
2.1 A Leptospirose.....	12
2.2 Agente etiológico.....	12
2.3 Reservatórios e fontes de infecção.....	13
2.4 Características clínicas.....	14
2.5 Epidemiologia.....	15
2.6 Controle e tratamento.....	16
2.7 Vacinas.....	16
2.8 Diagnóstico.....	17
2.8.1 Soroaglutinação microscópica (MAT).....	17
2.8.2 ELISA.....	19
2.8.3 Métodos diretos.....	19
2.8 Leptospirose ovina.....	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. ARTIGO.....	24
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A.....	54

## 1. INTRODUÇÃO

Este Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biotecnologia apresenta, inicialmente, uma revisão que aborda os principais aspectos da infecção por *Leptospira* spp. Na sequência, é apresentado um artigo científico que trata da avaliação da prevalência da leptospirose ovina na mesorregião Sudeste do estado do Rio Grande do Sul. O artigo foi enquadrado nas normas de publicação da revista “Ciência Rural”, para a qual será futuramente submetido.

## 2. REVISÃO

### 2.1 A Leptospirose

A leptospirose, causada por bactérias do gênero *Leptospira*, é uma doença sistêmica de importância global que afeta humanos e espécies de animais domésticos e silvestres. A ocorrência da doença é favorecida pelas condições ambientais vigentes nas regiões de clima tropical e subtropical, onde as elevadas temperaturas e períodos com altos índices pluviométricos favorecem o aparecimento de surtos epidêmicos de caráter sazonal, devido às condições ambientais propícias à proliferação de roedores e consequente disseminação do agente etiológico (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A leptospirose é uma zoonose de alta importância devido aos prejuízos que acarreta, não só em nível de saúde pública, devido à alta incidência de casos em humanos, como também econômicos, em virtude do alto custo hospitalar dos pacientes, da perda de dias de trabalho e das alterações na esfera reprodutiva dos animais infectados (PLANK; DEAN, 2000; LEVETT, 2001; VIJAYACHARI, et al., 2008). Ao afetar pequenos ruminantes causa perdas econômicas, devido às consequências decorrentes da forma crônica da doença, como óbitos neonatais, abortos e diminuição da produção de leite (MCKEOWN; ELLIS, 1986; LILENBAUM, et al., 2007).

### 2.2 Agente etiológico

O gênero *Leptospira*, pertencente à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales, inclui espécies patogênicas e saprófitas de microrganismos (FAINE, 1999). A família compreende 13 espécies patogênicas de *Leptospira*: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*, com mais de 260 sorovares. As saprófitas contêm mais de 60 sorovares e incluem as espécies *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii* (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). A diversidade de sorovares de leptospiros resulta,

principalmente, da heterogeneidade estrutural dos carboidratos componentes do lipopolissacarídeo (LPS) (MCBRIDE, et al., 2005).

Leptospiras possuem cerca de 0,1 µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento e membrana dupla, onde o peptidoglicano da parede celular e a membrana citoplasmática encontram-se intimamente associados e sobrepostos por uma membrana externa contendo o LPS e várias lipoproteínas (proteínas de membrana externa) (CULLEN, et al., 2004; KO, et al., 2009). Apresentam extremidades distintas em forma de gancho e dois flagelos com inserção polar, localizados no espaço periplasmático e responsáveis pela motilidade (FAINE, 1999; RADDI, et al., 2012).

As leptospiras são aeróbias obrigatórias, apresentam temperatura ótima de crescimento entre 28 e 30 °C, crescem em meio simples enriquecido com vitaminas, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônio. A dimensão do seu genoma é de 3,9 e 4,6 Mb (BULACH, et al., 2006). Possuem afinidade tintorial pelos corantes argênticos e podem ser visualizadas por microscopia de campo escuro e de contraste de fase (FAINE, 1999).

### **2.3 Reservatórios e fontes de infecção**

Infecções de animais ou seres humanos por *Leptospira* spp. resultam do contato direto ou indireto com a urina de animais portadores, que incluem, principalmente, roedores e marsupiais pequenos, bovinos, suínos e cães. Algumas espécies de roedores, como *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, não apresentam sinais clínicos da doença, mas servem como reservatório da mesma, pois são capazes de albergar leptospiras nos rins, tornando-se uma importante fonte de infecção para seres humanos e outros animais (KO, et al., 2009).

A entrada do microorganismo no hospedeiro, seja ele humano ou animal, se dá através de pequenos cortes ou pelas membranas mucosas da boca, narinas e olhos. Pode também ocorrer através da pele íntegra, quando imersa em água por longo período de tempo (FAINE, 1999). Após penetrar no organismo, as leptospiras patogênicas se disseminam na corrente sanguínea e se alocam principalmente nos túbulos proximais dos rins de hospedeiros, embora outros tecidos e órgãos possam

também servir como uma fonte de infecção. Em animais reservatórios, as leptospiras são excretadas vivas através da urina, contaminando água e solo (LEVETT, 2001).

A doença ocorre tanto em nível rural quanto urbano, estando relacionada, principalmente, com atividades recreativas, falta de saneamento básico e superpopulação (LEVETT, 2001). O contato com água contaminada em áreas urbanas mostra a importância do elo hídrico na transmissão da doença ao homem, pois a leptospira depende dele para sobreviver e alcançar o hospedeiro. A transmissão pode ocorrer também, de forma menos importante, através da manipulação ou ingestão de água, alimentos e tecidos animais contaminados. Os seres humanos não são importantes transmissores, sendo apenas hospedeiros acidentais pouco eficientes na perpetuação da doença (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Nos animais, a infecção geralmente ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados pela urina de animais doentes ou portadores. Em ovinos, a transmissão tem sido relacionada preferencialmente ao contato direto com urina ou pela água contaminada nos bebedouros coletivos, em sistemas de manejo intensivo ou extensivo, onde a criação das ovelhas é feita juntamente com os bovinos. A transmissão também pode ocorrer diretamente entre os ovinos dentro do rebanho por contato direto ou indireto com urina infectada, fluidos vaginais, placenta infectada, contato sexual ou infecção intra-uterina (ELLIS, 1994; FAINE, 1999; LILENBAUM, et al., 2008).

## **2.4 Características clínicas**

A leptospirose humana varia muito em gravidade, desde formas subclínicas até formas mais graves ou fatais. A apresentação da doença é bifásica, caracterizada por uma fase aguda ou septicêmica que dura em média uma semana, seguida pela fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos (LEVETT, 2001). O estágio inicial tende a apresentar pouca variação clínica, tendo aspecto semelhante na maioria dos pacientes. Ao contrário da fase inicial, a segunda fase da leptospirose assume muitas formas clínicas, incluindo forma anictérica, ictérica, síndrome de Weil e síndrome hemorrágica pulmonar. Em geral, a maioria das

complicações ocorre na fase imune da doença e estão associadas à localização das leptospiras nos tecidos.

Na forma anictérica, que dura cerca de uma semana, a doença tem início abrupto com febre acompanhada de calafrios, cefaléia e mialgia principalmente nos músculos da panturrilha e seu término está associado ao surgimento de anticorpos. A leptospirose ictérica se apresenta de forma muito mais grave, com curso clínico rapidamente progressivo, podendo evoluir para um quadro com disfunção renal, fenômenos hemorrágicos, alterações hemodinâmicas, cardíacas, pulmonares e de consciência (doença de Weil), com taxas de letalidade entre 10% e 40% (VINETZ, 2001). A hemorragia pulmonar é a manifestação mais letal na leptospirose, manifestando-se clinicamente com tosse, dispnéia e hemoptise, que podem ocorrer tanto na forma ictérica como na forma anictérica da doença (DOLHNIKOFF, et al., 2007).

Em animais de produção, as manifestações estão relacionadas a problemas reprodutivos como abortos, retenção de placenta, fetos prematuros, infertilidade e mastites, influenciando na queda da produção de leite e carne, o que resulta em significativas perdas econômicas no setor (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; FAINE, 1999).

## **2.5 Epidemiologia**

A leptospirose é uma zoonose amplamente distribuída no mundo, sendo que as maiores taxas de incidência estão em locais de clima tropical ou subtropical, devido ao aumento da sobrevivência das leptospiras em ambientes de clima quente e úmido (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Epidemias urbanas ocorrem em cidades de países em desenvolvimento de todo o mundo durante fortes chuvas e inundações sazonais. A leptospirose é, portanto, cada vez mais um problema de saúde pública relacionado com mudanças climáticas e crescimento da população que vive em áreas com sistemas precários de saneamento básico e coleta de lixo (REIS, et al., 2008).

No Brasil, no período de 2004 a 2011, foram confirmados 30.580 casos de leptospirose humana (média anual de 3.822 casos) e 3.063 óbitos, com média de 382 óbitos/ano. A letalidade média no período foi de 10%. No ano de 2012, até o



mês de maio, já foram confirmados 1.194 casos e 99 óbitos, tendo a Região Sudeste do Brasil apresentado os maiores índices, com 536 casos confirmados da doença e 54 óbitos (BRASIL, 2012).

## **2.6 Controle e tratamento**

São poucas as medidas de prevenção e controle da leptospirose. Melhoria das condições higiênico sanitárias da população, controle de animais reservatórios, armazenamento apropriado de alimentos e destino adequado do lixo são algumas medidas disponíveis para prevenção da enfermidade (WHO, 2003). Estratégias que utilizam vacinas compostas da célula inteira morta de leptospira (bacterina) têm sido usadas no Japão, Cuba, França e China, apresentando variados graus de sucesso acompanhados de problemas como efeitos colaterais (dor, febre e náuseas), imunidade de curto prazo e proteção restrita apenas aos sorovares que compõe a vacina (DELLAGOSTIN, et al., 2011).

O tratamento em humanos, durante a infecção, é feito através da administração de antibióticos como penicilina, ampicilina, amoxicilina, oxitetraciclina e doxiciclina (LEVETT, 2001). O antibiótico mais recomendado é a doxiciclina, com comprovada eficácia na proteção de indivíduos expostos (YAN, et al., 2003).

Nos animais, o controle envolve a aplicação de medidas que inclui identificação de fontes de infecção, controle no momento da aquisição de novos animais e imunização dos suscetíveis com vacinas contendo os sorovares de leptospirosas presentes na região (FAINE, 1999; DELLAGOSTIN, et al., 2011). A vacinação desempenha um papel importante no controle da doença, reduzindo a prevalência de animais soropositivos no rebanho (GERRITSEN, et al., 1994). Para o tratamento, a estreptomicina é umas das melhores opções (GIRIO, 2005), pois apresenta boa distribuição renal, destruindo as leptospirosas presentes nos túbulos renais (GERRITSEN, et al., 1994).

## **2.7 Vacinas**

Muitos problemas confrontam o desenvolvimento de uma vacina para prevenir a leptospirose. As vacinas atualmente disponíveis possuem várias limitações.

Apresentam imunidade pouco duradoura (6 a 12 meses), são sorovares específicas, geralmente produzem baixa imunidade (ZUERNER, et al., 2011; DELLAGOSTIN, et al., 2011) e, ainda não há conhecimento suficiente dos mecanismos protetores contra infecção de leptospirose. Vacinação de animais pode prevenir a enfermidade, mas não a leptospirose e, conseqüentemente, a transmissão para humanos (BOLIN, 2001).

Atualmente, os esforços estão concentrados na busca do desenvolvimento de vacinas produzidas a partir de antígenos comuns a diversos sorovares patogênicos, podendo assim, gerar proteção cruzada contra estes e induzir imunidade de longa duração contra a grande diversidade de leptospirose (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

## **2.8 Diagnóstico**

Em razão da inespecificidade da sintomatologia clínica e inexistência de lesões patognômicas, é necessária a confirmação laboratorial para realizar um diagnóstico preciso (FAINE, 1999). Reações sorológicas e moleculares foram descritas para o diagnóstico da leptospirose humana e animal (OOTEMAN, et al., 2006; BOMFIM, et al., 2008). Os testes podem ser diretos ou indiretos e destinados a detectar anticorpos, microrganismo ou DNA em tecidos e fluidos corporais (GROOMS, 2005). A Organização Mundial da Saúde recomenda a reação de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da Leptospirose (FAINE, 1999).

### **2.8.1 Soroaglutinação microscópica (MAT)**

O teste de aglutinação microscópica (MAT) com antígenos vivos é o mais utilizado na rotina clínica, tanto para humanos quanto para animais, e recomendado pela Organização Mundial da Saúde como a melhor alternativa para o diagnóstico da leptospirose (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O MAT é uma técnica bastante empregada em levantamentos epidemiológicos e a única capaz de fornecer informações a respeito dos sorovares e sorogrupos prevalentes na região analisada, os quais devem estar incluídos na bateria de antígenos a ser testada.

Para o diagnóstico da leptospirose através do MAT são recomendadas duas coletadas de soro (soros pareados), uma na fase aguda da doença e outra a partir da quarta semana (fase convalescente) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). O soro é considerado negativo para leptospirose quando o título é inferior a 100 e positivo quando for igual ou superior a este valor (PRADUTKANCHANA et al., 2003). A confirmação laboratorial da infecção é definida através do aumento de pelo menos quatro vezes no título das amostras pareadas de soro, certificando a soroconversão. Quando não houver a disponibilidade de duas ou mais amostras, um título igual ou superior a 800 no MAT confirma o diagnóstico. Títulos menores (entre 100 e 800) poderão ser considerados de acordo com a situação epidemiológica do local (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Na presença de sinais clínicos e histórico de contato com animais, existe um título fixo maior ou igual a 400 que caracteriza a infecção (GORIS, 2012). Em áreas endêmicas, uma única amostra com título igual ou maior que 800 pode ser considerada positiva, mas é recomendada a utilização de títulos iguais ou superiores a 1.600 para essa decisão.

A base diagnóstica do MAT é formada pela reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes e o antígeno-O do LPS dos vários sorovares de *Leptospira* spp. (FAINE, 1999). Esses anticorpos podem ser detectados no sangue aproximadamente de 5 a 7 dias após o início dos sintomas (FAINE, 1999; SAMBSIAVA, et al., 2003). Os anticorpos do tipo IgM podem ser detectados 5 dias após os sintomas (sensibilidade de 70%) e após 2 semanas (sensibilidade > 95%). O isotipo IgG é raramente detectado e não é considerado um bom marcador para o diagnóstico (PRADUTKANCHANA, et al., 2003).

Apesar de bastante sensível e específico, o MAT apresenta algumas dificuldades na interpretação dos resultados visto que os soros de indivíduos com títulos positivos geralmente apresentam reações cruzadas a uma variedade de sorovares, o que dificulta a identificação do sorovar infectante. Outra questão é em relação à exigência, para realização do MAT, de uma bateria de culturas vivas de leptospiros representantes de diversos sorogrupos prevalentes em uma determinada região, que deve ser conservada com repiques semanais, gerando alto custo de manutenção (CUMBERLAND, et al., 1999; SUGUNAN AP, 2002; SMYTHE, et al., 2002).

### 2.8.2 ELISA

Outra técnica sorológica aplicada para diagnosticar leptospirose é o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). É um teste bastante sensível, específico, rápido e de fácil execução, geralmente utilizado para detectar anticorpos do isotipo IgM. Apesar de ser bastante empregado, o teste apresenta sensibilidade e especificidade menores quando comparado ao MAT, não sendo recomendado seu uso como método exclusivo de diagnóstico (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O ELISA detecta somente a presença de anticorpos contra a bactéria, não sendo apropriado para a identificação do sorogrupo ou sorovar (WHO, 2003).

### 2.8.3 Métodos diretos

O diagnóstico por métodos diretos pode ser realizado através de cultura bacteriana, histopatologia, reação em cadeia da polimerase (PCR), dentre outros (HARTSKEERL, et al., 2011). A cultura bacteriana é um método definitivo de diagnóstico. A urina deve ser coletada após aplicação de furosemida para aumentar a filtração glomerular, liberando mais leptospiras e diluindo a urina, o que aumenta a sobrevivência das leptospiras. Esse método tem como desvantagem ser mais difícil, demorado e caro. O exame histopatológico com sais de prata é o único que pode utilizar tecidos conservados em formol (renais, placentários, pulmonares e hepáticos em casos de aborto), tendo como desvantagem uma baixa sensibilidade e incapacidade de detectar o sorovar infectante (GROOMS, 2005).

A PCR baseia-se na detecção e amplificação do DNA de *Leptospira* spp. de diversos tecidos ou fluidos corpóreos, tais como amostras de sangue, urina e fluido cérebro-espinhal, para diagnóstico antes ou após a morte do animal. A avaliação das variáveis tempo, sensibilidade, especificidade e custo-benefício mostra que a PCR é um método bastante promissor quando destinado ao diagnóstico precoce da leptospirose. Porém, a limitação do diagnóstico está na inabilidade em se identificar o sorovar infectante. Os melhores resultados da PCR como método diagnóstico são utilizando a variação PCR quantitativo em tempo real (SLACK, et al., 2007; AHMED, et al., 2009).

## 2.9 Leptospirose ovina

A ovinocultura têm se destacado no agronegócio brasileiro, tendo grande representatividade na região Nordeste e no estado do Rio Grande do Sul. Carne, pele e lã estão entre os principais produtos. A produção anual alcança 11 milhões de toneladas de lã, principalmente no Rio Grande do Sul, com cadeia produtiva formada por 35 mil estabelecimentos agropecuários. Falhas na cadeia reprodutiva de ovinos, decorrentes da infecção por leptospirose, tem sido um obstáculo para a expansão da ovinocultura no Brasil (ARAÚJO NETO, 2010). Muitos prejuízos econômicos resultam da falta de manejo preventivo, tanto sanitário como reprodutivo, causando interferência na taxa de parição dos animais, abortos, natimortos, nascimento de animais debilitados e infertilidade (MCKEOWN; ELLIS, 1986; LILENBAUM, et al., 2007; ARAÚJO NETO, 2010).

A leptospirose ovina é uma infecção cosmopolita e está intimamente relacionada a fatores ambientais, sendo, sua incidência, agravada em propriedades que adotam atividades consorciadas com outras espécies animais (LANGONI, 1995). A criação com bovinos tem sido apontada como fator principal, onde os ovinos adquirem a infecção pela urina e bebedouros coletivos (FERNANDES, 2009; ESCÓCIO, 2010). Além disso, estudos sugerem que também pode ocorrer transmissão entre as ovelhas, ao constatar que ovelhas que nunca haviam tido contato com bovinos apresentaram elevada proporção de animais soropositivos para o sorovar Hardjo (GENOVEZ, 2011). Outra forma de adquirir a infecção é através de ambientes contaminados pela urina de roedores, cães, bovinos, suínos e outros animais infectados e pela ingestão de leite de vacas infectadas, no caso de cordeiros (WINTER, 1989; CICERONI, et al., 2000).

A leptospirose pode manifestar-se de forma aguda e crônica nos ovinos, caracterizando-se por quadros clínicos de septicemia, hemorragia e nefrite, seguidos por icterícia, hemoglobinúria, mastite sanguinolenta, aborto nas ovelhas, principalmente no terço final de gestação, e anemia hemolítica nos cordeiros com morte na primeira semana de vida (ACHA, 1986; CICERONI, et al., 2000). Tem sido observado o aumento do número de fetos mumificados, natimortos e cordeiros fracos ao nascer devido a infecções por *Leptospira* de vários sorovares (GERRITSEN, et al., 1994; ELLIS, 1994).

Inquéritos sorológicos realizados em diversos países evidenciaram que a infecção de ovinos por *Leptospira* spp. está associada, na maioria dos casos, à presença do sorovar Hardjo, grande responsável pelas perdas reprodutivas em ovelhas e morte de cordeiros (CICERONI, et al., 2000; HERRMANN, 2004). No Brasil, outros sorovares já foram descritos como responsáveis por reações sorológicas, como Australis, Autumnalis, Bratislava, Butembo, Canicola, Castellonis, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Pomona e Tarassovi (HERRMANN, 2004; FÁVERO, 2002). Estudos mais recentes realizados em diferentes regiões do país mostram taxas de positividade para leptospirose que variam de 5,41% (ALVES, 2012) a 33,3% (AGUIAR, 2010), com predominância dos sorovares Autumnalis (ALVES, 2012; MORAES, 2012), Patoc (AGUIAR, 2010), Icterohaemorrhagiae (HIGINO, 2010) e Serjroe (sorovar Hardjo) (SALABERRY, 2011). No Rio Grande do Sul, Herrmann e colaboradores (2004) observaram taxas de positividade de 34,26% ao pesquisarem 1360 amostras de soros de ovinos. No mesmo estado, Silva e colaboradores (2007), isolaram recentemente uma cepa virulenta identificada como *L. noguchii* sorogrupo Autumnalis, a partir de amostras de rins de ovinos abatidos no município de Pelotas.

O controle da leptospirose nos ovinos envolve a aplicação de medidas que incluem a identificação das fontes de infecção, o controle no momento da aquisição de animais e a imunização com vacinas que contenham os sorovares de leptospirosas presentes na região (FAINE, 1999). A vacinação tem se revelado uma medida eficiente no controle de focos, produzindo boa imunidade, prevenindo sintomas como o aborto e a morte embrionária com absorção, assim como o aparecimento de outros sinais clínicos característicos da doença (SOUZA SEIXAS MELO, 2010). Outra vantagem da vacinação é que o custo de cada dose da vacina é significativamente menor que a dose de antibiótico utilizado no tratamento, caso haja infecção (HERRMANN, et al., 2002).

No Brasil, existem vacinas disponíveis no mercado para utilização em animais (principalmente bovinos, suínos e caninos), havendo poucos estudos referentes à eficiência dessas vacinas em ovinos (HERRMANN, et al., 2002). Porém, ainda assim, bacterinas comerciais são utilizadas para o controle da doença nos rebanhos ovinos. Destaca-se ainda, que o sucesso dos programas de vacinação depende de

contínuos estudos epidemiológicos visando monitorar a ocorrência de diferentes sorovares de leptospiras em uma população (WANG, et al., 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Determinar, através do MAT, a frequência de ovinos reagentes para a leptospirose na mesorregião Sudeste do estado do Rio Grande do Sul.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar MAT dos soros coletados de 847 animais provenientes da mesorregião Sudeste do estado do Rio Grande do Sul;
- Titular os soros reagentes no MAT;
- Determinar os sorogrupos predominantes na região estudada;
- Analisar os dados coletados através do questionário epidemiológico e avaliar a presença de fatores de risco relacionados à leptospirose ovina.



#### 4. ARTIGO

### **SOROPREVALÊNCIA DA LEPTOSPIROSE OVINA NA MESORREGIÃO SUDESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

XIMENDES, Carolina<sup>1\*</sup>; GRASSMANN, André A.<sup>1</sup>; FÉLIX, Samuel R.<sup>1,3</sup>; SEIXAS NETO, Amilton C. P.<sup>1</sup>; PAPPEN, Felipe G.<sup>2</sup>; FARIAS, Nara A. R.<sup>2</sup>; BORSUK, Sibeles<sup>1</sup>; SILVA, Éverton F.<sup>3</sup>, DELLAGOSTIN, Odir A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel

## 1 **Resumo**

2           A leptospirose é uma zoonose de importância devido aos prejuízos econômicos que  
3 acarreta à produção animal. Falhas na cadeia reprodutiva de ovinos, decorrentes da infecção  
4 por leptospirose, tem sido um obstáculo para a expansão da ovinocultura no Brasil. A  
5 pesquisa realizada buscou determinar a prevalência de ovinos reagentes para leptospirose,  
6 assim como os sorogrupos predominantes e alguns fatores de risco associados à ovinocultura  
7 em municípios da mesorregião Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Para isso, 847 amostras  
8 de sangue foram coletadas de animais procedentes de 92 propriedades distribuídas em 21  
9 municípios do estado. Paralelamente, foi realizado um questionário epidemiológico, contendo  
10 informações que pudessem fornecer dados sobre a epidemiologia da leptospirose na região. A  
11 frequência de anticorpos anti-*Leptospira* nos rebanhos ovinos foi avaliada através do teste de  
12 aglutinação microscópica (MAT), que é o padrão-ouro para o diagnóstico da doença. Foi  
13 utilizada uma bateria de 5 sorogrupos de *Leptospira* spp. como antígenos no MAT. Dos  
14 animais analisados, 191 foram reagentes, com títulos variando de 100 a 400, o que  
15 representou uma prevalência de 22% da doença na região. Os resultados obtidos mostraram  
16 que a maior frequência de animais reagentes ocorreu com o sorogrupo Pomona, seguido dos  
17 sorogrupos Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Serjroe (sorovar Hardjo) e Canicola. As  
18 propriedades onde a alimentação dos animais era suplementada com sal mineral foram  
19 associadas a maiores índices de ovinos reagentes para leptospirose. Os resultados mostraram  
20 que *Leptospira* spp. são agentes presentes entre os rebanhos ovinos da mesorregião Sudeste  
21 do Rio Grande do Sul.

22

23 **Palavras-chave:** Leptospirose, ovinos, epidemiologia, MAT, Rio Grande do Sul.

24 **Abstract**

25         Leptospirosis is a zoonosis of importance due to the economic losses that it causes to  
26 the production chain. Reproductive failures of sheep, resulting from leptospirosis infection  
27 has been an obstacle to the expansion of sheep production in Brazil. We conducted a survey to  
28 determine the prevalence of sheep seropositive for leptospirosis, as well as the prevalent  
29 serogroups and some risk factors associated with the sheep industry in Southeastern region of  
30 Rio Grande do Sul, Brazil. For this purpose, 847 blood samples were collected from animals  
31 of 92 properties distributed in 21 municipalities. In parallel, we performed an epidemiological  
32 questionnaire, containing information that could provide data on the epidemiology of  
33 leptospirosis in the region. The frequency of anti-*Leptospira* antibodies in sheep flocks was  
34 assessed by the microscopic agglutination test (MAT), which is the gold standard for  
35 diagnosis. We used a battery of five serogroups of *Leptospira* spp. as antigens in MAT. Of the  
36 animals tested, 191 were positive, with titres ranging from 100 to 400. The results showed  
37 that the highest frequency of seropositive animals occurred with serogroup Pomona, followed  
38 by serogroups Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Serjroe (Hardjo), Canicola. The properties  
39 where the animal feed was supplemented with mineral salt were associated with higher rates  
40 of sheep tested positive for leptospirosis. The results showed that *Leptospira* spp. are present  
41 among the flocks of sheep in Southeast of Rio Grande do Sul.

42

43 **Keywords:** Leptospirosis, sheep, epidemiology, MAT, Rio Grande do Sul.

## 44 **Introdução**

45

46           Enfermidade mundialmente distribuída, a leptospirose é uma zoonose de alta  
47 importância causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Esse agente possui  
48 um grande número de variantes sorológicas que não apresentam especificidade de hospedeiro,  
49 podendo afetar humanos e animais domésticos e selvagens, representando, portanto, um  
50 importante problema de saúde pública (FAINE, 1999). A ocorrência e a transmissão da  
51 leptospirose são influenciadas pelas características do agente infeccioso, à suscetibilidade de  
52 hospedeiros, concentração demográfica, interação entre espécies e populações, finalidade de  
53 uso dos animais e condições ambientais (HERHOLZ, 2006). A doença é responsável por  
54 elevados prejuízos de saúde e econômicos tanto na saúde humana quanto animal, em virtude  
55 da alta prevalência e alterações causadas na esfera reprodutiva dos animais infectados  
56 (VIJAYACHARI, et al., 2008; PLANK, 2000; LEVETT, 2001).

57           Falhas na cadeia reprodutiva de ovinos, decorrentes da infecção por leptospirose, tem  
58 sido um obstáculo para a expansão da ovinocultura no Brasil (ARAÚJO NETO, 2010).  
59 Muitos prejuízos econômicos resultam da falta de manejo preventivo, tanto sanitário como  
60 reprodutivo, causando interferência na taxa de parição dos animais, abortos, natimortos,  
61 nascimento de animais debilitados e infertilidade (MCKEOWN; ELLIS, 1986;  
62 LILENBAUM, et al., 2007; ARAÚJO NETO, 2010). Os ovinos são portadores e eliminadores  
63 da bactéria na urina por um longo período de tempo (HATHAWAY, 1981). Essa eliminação  
64 prolongada pode constituir um problema zoonótico para todos que tiverem contato com os  
65 animais, como tratadores, produtores e trabalhadores de frigoríficos (COUSINS;  
66 ROBERTSON, 1986).

67           Entre os fatores envolvidos na infecção por *Leptospira* spp. nas criações de ovinos, a  
68 criação consorciada com bovinos tem sido apontada como fator principal, onde os ovinos

69 adquirem a infecção através da urina e bebedouros coletivos (FERNANDES, 2009;  
70 ESCÓCIO, 2010). Por outro lado, estudos constataram que ovelhas que nunca haviam tido  
71 contato com bovinos apresentaram elevada proporção de animais soropositivos para o sorovar  
72 Hardjo, sugerindo que também poderia ocorrer transmissão ativa entre ovelhas (GENOVEZ,  
73 2011). Taxas de positividade para leptospirose em ovinos de 34,26% foram observadas no  
74 Rio Grande do Sul em pesquisa realizada com 1360 amostras de soros de ovinos  
75 (HERRMANN, 2004). Outros estudos recentes realizados em diferentes regiões do Brasil  
76 mostram taxas que variam de 5,41% (ALVES, 2012) a 33,3% (AGUIAR, 2010) de  
77 positividade, com predominância dos sorovares Autumnalis (ALVES, 2012; MORAES,  
78 2012), Patoc (AGUIAR, 2010), Icterohaemorrhagiae (HIGINO, 2010) e Serjroe  
79 (SALABERRY, 2011).

80 Em razão da inespecificidade da sintomatologia clínica e inexistência de lesões  
81 patognômicas para a realização de um diagnóstico preciso, os exames laboratoriais são  
82 essenciais. O teste de aglutinação microscópica (MAT) com antígenos vivos é o mais  
83 utilizado por pesquisadores de todo o mundo para diagnóstico da leptospirose, sendo  
84 recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a melhor alternativa  
85 (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O trabalho consistiu em avaliar, através do  
86 MAT, a frequência de ovinos reagentes para a leptospirose, os sorogrupos predominantes na  
87 região estudada e fatores de risco associados à ovinocultura. Foram analisadas amostras  
88 coletadas em 92 propriedades com criação de ovinos, distribuídas em 21 municípios da  
89 mesorregião do Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil.

## 90 **Materiais e métodos**

91

### 92 **1. Área amostral**

93

94 O material do estudo foi obtido em propriedades com criação de ovinos, situadas na  
95 mesorregião Sudeste do Estado do Rio Grande do Sul. Foram incluídos na análise 21  
96 municípios localizados entre os paralelos 31°S e 34°S, representados na figura 1.

97

### 98 **2. Coleta das amostras**

99

100 As atividades de campo, realizadas por Pappen, incluíram a coleta de sangue e  
101 aplicação do questionário epidemiológico (PAPPEN, 2008). As amostras de sangue total, sem  
102 anticoagulante, foram colhidas de ovinos em tubos a vácuo, em alíquotas duplas, através da  
103 punção da veia jugular com agulha descartável. As amostras foram centrifugadas (2000 x g),  
104 para separar o soro do coágulo, acondicionadas em microtubos e congeladas até a realização  
105 da prova sorológica. Foram coletadas amostras de 847 animais distribuídos em 92  
106 propriedades. O número de animais em cada propriedade não foi padrão, variando de 1 a 19.

107 O processamento do sangue total e a conservação das amostras de soro foram  
108 realizados no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia  
109 do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os testes sorológicos  
110 foram realizados no Laboratório de Vacinologia da Unidade de Biotecnologia do Centro de  
111 Desenvolvimento Tecnológico da UFPel.

112 O questionário epidemiológico foi realizado com o intuito de avaliar os fatores de  
113 risco da população ovina da região e, para isso, foram coletadas informações referentes a cada  
114 propriedade: área destinada à ovinocultura, finalidade da ovinocultura (lã ou corte), tipo de

115 criação (extensivo, semiextensivo ou intensivo), fornecimento de ração, suplementação  
116 alimentar com sal mineral, contato com outros animais (bovinos, equinos, suínos, caprinos,  
117 aves domésticas, cães, gatos, canídeos silvestres, felinos silvestres, cães errantes e felinos  
118 errantes), destino das carcaças, destino das vísceras, taxa de natalidade, nascimento de ovinos  
119 ou outros animais fracos e ocorrência de aborto em ovinos ou em outras espécies (Anexo A).

120

### 121 **3. Cepas**

122

123 Foi utilizada uma coleção de antígenos vivos que incluiu os sorogrupos Autumnalis,  
124 Canicola, Serjroe (sorovar Hardjo), Icterohaemorrhagiae e Pomona. As culturas de leptospira  
125 foram mantidas a 28°C em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) acrescido  
126 de 10% de suplemento comercial (Difco) e repicadas semanalmente. As culturas utilizadas no  
127 teste diagnóstico tinham em média 6 dias e uma densidade de aproximadamente  $2 \times 10^8$   
128 leptospiras por mL de cultura. Os antígenos eram examinados ao microscópio de campo  
129 escuro, previamente aos testes, e, se observada autoaglutinação ou ausência de mobilidade na  
130 cultura, a mesma era descartada.

131

### 132 **4. Teste de microaglutinação**

133

134 O diagnóstico sorológico de leptospirose foi realizado, de acordo com Galton e Cole  
135 (GALTON, et al., 1965; COLE; PURSELL, 1973), através da técnica de MAT utilizando os  
136 sorogrupos Autumnalis, Canicola, Serjroe, Icterohaemorrhagiae e Pomona.

137 Para realização dos testes de triagem, os soros foram diluídos em PBS, com diluição  
138 inicial de 1:50. Em seguida, 50 uL de cada amostra de soro diluído foram colocados em  
139 microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços e acrescidos de 50 µL do antígeno,

140 obtendo-se diluição final de 1:100. As microplacas foram incubadas em estufa a 28°C por  
141 duas horas. As leituras foram realizadas em microscópico de campo escuro, observando-se a  
142 formação de aglutinações. Os soros que apresentaram 50% ou mais de leptospiras aglutinadas  
143 na triagem foram testados novamente para definir o título de anticorpos frente aos respectivos  
144 antígenos, efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois. O título final  
145 foi a recíproca da maior diluição que apresentou pelo menos 50% de leptospiras aglutinadas.

146

## 147 **5. Análise estatística**

148

149 Para análise de possíveis fatores de risco associados com a condição de propriedade  
150 positiva para a infecção por *Leptospira* spp. foram utilizados os dados coletados nos  
151 questionários epidemiológicos. A caracterização da associação entre as variáveis observadas  
152 nas frequências de animais reagentes foi determinada pelo teste chi-quadrado, com auxílio do  
153 programa Statistix 9.0.



## 154 **Resultados**

155

156 O material deste estudo foi coletado de 92 propriedades localizadas em 21 municípios  
157 da mesorregião Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram avaliados 847 animais quanto à  
158 presença de anticorpos aglutinantes contra cinco diferentes sorogrupos de leptospiros, sendo  
159 191 deles considerados positivos para pelo menos um sorogrupo no título de triagem (100), o  
160 que representou uma prevalência geral da doença nos animais de 22%. Quando consideradas  
161 propriedades com ao menos um animal reagente, foi possível observar que 72 (80%) das  
162 estudadas apresentaram animais positivos (Figura 2).

163 Considerando os municípios da mesorregião Sudeste do estado que fizeram parte do  
164 estudo, todos apresentaram animais positivos, exceto Pedro Osório, que não teve uma amostra  
165 representativa. A prevalência nos municípios variou de 4,34% no município de Rio Grande a  
166 44,44% em Turuçu (Tabela 1).

167 Os animais positivos, em geral, apresentaram títulos baixos. O título inicial de triagem  
168 foi de 100, sendo este, também, o título mais frequente (81,63%). Não houve animais com  
169 título superior a 400 (Tabela 2). Dos 191 animais positivos, 135 foram positivos para apenas  
170 um sorogrupo e os demais foram positivos para dois ou mais sorogrupos, representando um  
171 total de 294 reações positivas (Tabela 3). O sorogrupo mais frequente foi Pomona, com 72  
172 (24,4%) soros positivos, seguido dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae (22%), Autumnalis  
173 (20,4%), Serjroe (sorovar Hardjo) (18,3%) e Canicola (14,9%).

174 Dentre os fatores avaliados, o único que pode ser associado à leptospirose em todas as  
175 propriedades positivas foi a suplementação da alimentação dos animais com sal mineral  
176 ( $p < 0,01$ ) (Tabela 4). Das 28 propriedades que suplementavam a alimentação com sal mineral,  
177 22 apresentavam animais reagentes para leptospirose. Outros fatores tiveram alguma relação

178 com a doença quando sorogrupos específicos foram avaliados. O sorovar Hardjo está  
179 associado ao destino inapropriado das carcaças e vísceras ( $p<0,01$ ), já que 39 (61,9%) das  
180 propriedades positivas para estas variáveis foram também positivas para o sorovar Hardjo. Da  
181 mesma forma, a presença de canídeos silvestres é um fator relacionado com a presença deste  
182 mesmo sorogrupo ( $p<0,05$ ). O sorogrupo Canicola está associado à presença de suínos e ao  
183 destino inadequado de carcaças e vísceras ( $p<0,05$ ), já que 21 (63,6%) propriedades positivas  
184 para este sorogrupo tinham criação de suínos e 24 (72,7%) não davam destino correto às  
185 carcaças (Tabela 4). A criação de bovinos e ovinos na mesma propriedade foi o único fator  
186 comum a todas as propriedades incluídas no estudo. Os demais fatores referentes a cada  
187 propriedade, coletados no questionário epidemiológico, não tiveram correlação positiva com  
188 propriedades onde havia animais reagentes para leptospirose.

189

## 190 **Discussão**

191

192 Inquéritos sorológicos que avaliem frequência, distribuição e fatores de risco  
193 associados à determinada infecção são de suma importância para aplicação no controle de  
194 doenças como a leptospirose. Neste trabalho, a soroprevalência da leptospirose em ovinos  
195 (22%) evidencia que a infecção por *Leptospira* spp. encontra-se disseminada nos animais do  
196 estado do Rio Grande do Sul, que possui 3.979.258 cabeças em seu rebanho (IBGE, 2010).  
197 Este resultado concorda com o que foi descrito por Herrmann e colaboradores em 2004 para a  
198 mesma região, onde foi observada prevalência de 34,26% (HERRMANN, 2004). Nos dois  
199 estudos, a proporção de propriedades afetadas, 80% e 83,09%, respectivamente, reforça a  
200 dispersão da infecção nos rebanhos e chama atenção para os riscos e prejuízos que a  
201 incidência da doença na região pode estar causando à produção e aos trabalhadores.

202 A prevalência de 22% encontrada neste estudo não divergiu do esperado para  
203 leptospirose ovina no Brasil. Estudos têm encontrado prevalências menores, como as descritas  
204 por Moraes (MORAES, 2012) no estado do Pará utilizando 104 ovinos, que apresentou  
205 14,42% de animais positivos; Melo em 2009 com 3% de amostras positivas (MELO, 2009); e  
206 Lilienbaum e colaboradores com 13,7% (LILENBAUM, et al., 2008). Da mesma forma, taxas  
207 superiores às encontradas no presente trabalho também foram notificadas. Em estudo na  
208 Bahia com 219 amostras, 89,5% dos ovinos mostraram reações positivas para leptospirose  
209 (VIEGAS, 1994) e Aguiar e colaboradores (AGUIAR, 2010), ao avaliar 141 animais,  
210 encontraram uma taxa de 33,3% de positivos. As variadas prevalências encontradas em  
211 estudos de caracterização epidemiológica demonstram que a leptospirose vem ocorrendo com  
212 diferentes graus de incidência nos rebanhos ovinos. Neste trabalho, foi demonstrada variação  
213 entre propriedades da mesma região de 4,34% a 44,44% (Tabela 1). Essas variações podem  
214 estar associadas a fatores regionais e ambientais, aos sorovares/sorogrupos utilizados no  
215 diagnóstico, bem como ao tipo de manejo que os ovinos são submetidos e o contato com  
216 outros animais, o que interfere na epidemiologia da enfermidade (ALVES, 2000).

217 Das 294 reações positivas observadas, verificou-se uma variação nos títulos  
218 aglutinantes de 100 a 400. Os títulos encontrados, aparentemente baixos, estão dentro do  
219 esperado para ovinos e não diferem de outros reportados recentemente, onde 73,9% dos  
220 animais considerados positivos apresentaram títulos iguais ou menores que 200 (ALVES,  
221 2012). Lilienbaum e colaboradores (2009) encontraram título máximo de 400 (LILENBAUM,  
222 et al., 2009). Os animais testados reagiram contra os sorogrupos Pomona (24,4%),  
223 Icterohaemorrhagiae (22%), Autumnalis (20,4%), Serjroe (sorovar Hardjo) (18,3%) e  
224 Canicola (14,9%). Estudos anteriores justificam o uso desses sorogrupos. No Brasil,  
225 diferentes trabalhos relataram reações para os sorogrupos Pomona (SANTA ROSA, 1963;  
226 CALDAS, 1998; AZEVEDO, 2004) e Canicola (CALDAS, 1998; SANTA ROSA, 1969). No

227 Rio Grande do Sul, o sorovar Hardjo (HERRMANN, 2004) e os sorogrupos Autumnalis e  
228 Icterohaemorrhagiae (SILVA, et al., 2007) foram referidos como os mais prevalentes. Ainda  
229 que esses sejam os sorogrupos predominantes na região estudada, é possível que outros  
230 também possam estar presentes, o que faria a prevalência da doença aumentar, caso os testes  
231 fossem realizados com uma bateria composta de mais antígenos.

232 As propriedades avaliadas em que a alimentação dos animais era suplementada com  
233 sal mineral foram associadas a maiores índices de ovinos reagentes para leptospirose  
234 ( $p < 0,01$ ). As possíveis explicações para esta observação são apenas especulativas e carecem  
235 de comprovação. Espera-se que o consumo de sal mineral pelos ovinos leve-os a uma maior  
236 ingestão de água, que por senso comum ocorre em locais úmidos, onde as leptospirosas podem  
237 sobreviver e infectar novos hospedeiros. Além disso, o consumo de água pode ocorrer via  
238 bebedouros coletivos, comuns para ovinos e bovinos, o que poderia facilitar a transmissão  
239 entre os animais (FERNANDES, 2009). O consumo de água em bebedouros coletivos não foi  
240 avaliado neste estudo. Fatores como a criação de ovinos consorciada com bovinos tem sido  
241 frequentemente citados como determinante principal na infecção por *Leptospira*  
242 spp. (FERNANDES, 2009; ESCÓCIO, 2010). Este tipo de análise foi realizada no presente  
243 estudo, porém não foi encontrada associação, uma vez que em todas as propriedades  
244 estudadas a criação de ovinos e bovinos era concomitante.

245 Os resultados deste e outros trabalhos de cunho epidemiológico sugerem a necessidade  
246 da implantação de um programa sanitário na pecuária de ovinos, visando determinar os  
247 agentes infecciosos mais prevalentes nas regiões e propor medidas de controle para esta  
248 importante infecção que vem acometendo rebanhos ovinos não só no Rio Grande do Sul, mas  
249 em diversas regiões do Brasil. Os resultados obtidos aqui sustentam a inclusão dos sorogrupos

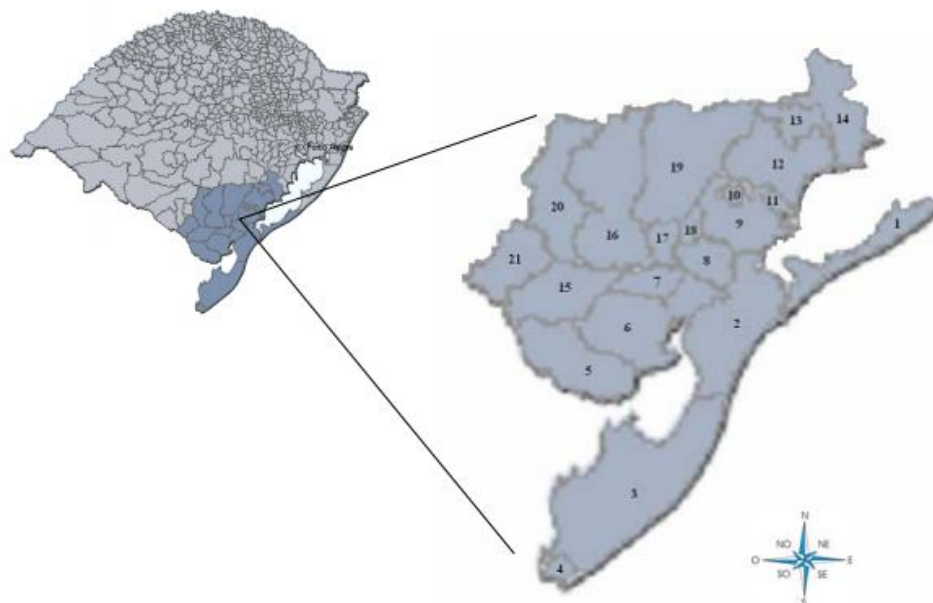
250 Pomona, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Serjroe (sorovar Hardjo) e Canicola em  
251 preparações vacinais contra leptospirose ovina no Rio Grande do Sul.

252

### 253 **Conclusões**

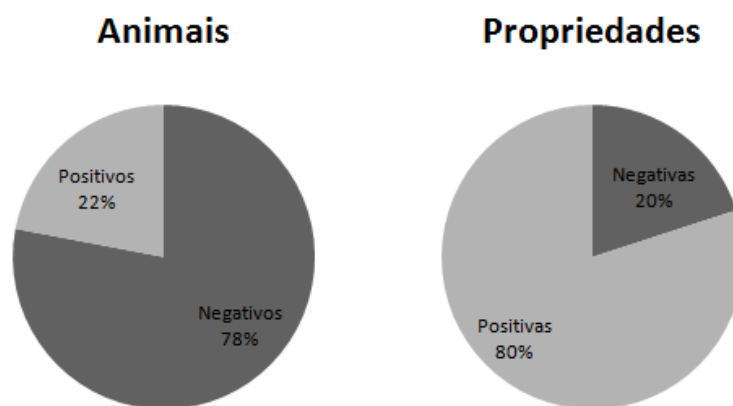
254

255 *Leptospira* spp. são agentes presentes entre os rebanhos ovinos da mesorregião  
256 Sudeste do Rio Grande do Sul. Das propriedades incluídas no estudo, 80% apresentaram  
257 animais reagentes, o que representa uma prevalência de 22% da doença na região. O  
258 sorogrupo Pomona é o mais frequente na região estudada (24,48%). A suplementação da  
259 alimentação dos animais com sal mineral está associada a maiores índices de ovinos reagentes  
260 para leptospirose.



**Figura 1 – Mapa do estado do Rio Grande do Sul, com destaque para a localização dos municípios que fizeram parte do estudo (1. São José do Norte; 2. Rio Grande; 3. Santa Vitória do Palmar; 4. Chuí; 5. Jaguarão; 6. Arroio Grande; 7. Pedro Osório; 8. Capão do Leão; 9. Pelotas; 10. Arroio do Padre; 11. Turuçu; 12. São Lourenço do Sul; 13. Cristal; 14. Camaquã; 15. Herval; 16. Piratini; 17. Cerrito; 18. Morro Redondo; 19. Canguçu; 20. Pinheiro Machado; 21. Pedras Altas).**

**Fonte: IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2006.**



**Figura 2 – Prevalência de positivos para leptospirose ovina considerando a população amostrada e as propriedades.**

**Tabela 1 – Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em 847 soros ovinos de 21 municípios da mesorregião Sudeste do Rio Grande do Sul.**

Município	Animais			Propriedades	
	n° animais	positivos (%)		n° propriedades	positivas
Arroio do Padre	10	1	(10)	1	1
Arroio Grande	16	5	(31.25)	4	3
Camaquã	10	4	(40)	1	1
Canguçu	75	13	(17.33)	8	9
Capão do Leão	15	5	(33.33)	2	2
Cerrito	10	4	(40)	1	1
Chuí	19	5	(26.31)	1	1
Cristal	15	3	(20)	1	1
Herval	124	25	(20.16)	12	9
Jaguarão	25	6	(24)	4	4
Morro Redondo	6	1	(16.66)	1	1
Pedras Altas	51	11	(21.56)	5	5
Pedro Osório	1	0	(0)	1	0
Pelotas	17	4	(23.52)	1	1
Pinheiro Machado	104	28	(26.92)	11	9
Piratini	212	30	(14.15)	21	14
Rio Grande	23	1	(4.34)	4	1
S. Vit. do Palmar <sup>1</sup>	80	26	(32.5)	6	5
S. José do Norte <sup>2</sup>	32	7	(21.87)	3	3
S. Lourenço <sup>3</sup>	20	8	(40)	2	2
Turuçu	9	4	(44.44)	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>847</b>	<b>191</b>	<b>22%</b>	<b>92</b>	<b>74</b>

<sup>1</sup> Santa Vitória do Palmar; <sup>2</sup> São José do Norte; <sup>3</sup> São Lourenço do Sul



**Tabela 2 – Número e título de animais positivos para cada sorogrupo utilizado na triagem.**

<b>Título</b>	<b>Icterohaemorrhagiae</b>	<b>Canicola</b>	<b>Hardjo</b>	<b>Autumnalis</b>	<b>Pomona</b>	<b>Total</b>
100	64	29	54	44	50	<b>240</b>
200	1	13	0	16	15	<b>45</b>
400	0	2	0	0	7	<b>9</b>
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>44</b>	<b>54</b>	<b>60</b>	<b>72</b>	<b>294</b>

**Tabela 3 – Número de sorogrupos reativos por animal positivo.**

	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	<b>Total</b>
Positivos	135	26	15	12	3	<b>191</b>
%	70,7	13,6	7,9	6,3	1,6	<b>100</b>

**Tabela 4 – Características das propriedades incluídas no estudo que apresentam relação com soropositividade para leptospirose ou algum sorogrupo.**

Variáveis	nº total de propriedades	Total de positivos					
		Propriedades (%)	Pomona	Ictero*	Autumnalis	Hardjo	Canicola
Sal mineral	28	22 (78,5) <sup>1</sup>	15	14	12	8	10
Contato com bovinos	92	74 (80,4)	47	43	42	30	33
Contato com suínos	43	37 (86)	20	24	22	16	21 <sup>2</sup>
Contato com canídeos silvestres	90	72 (80)	47	41	40	28 <sup>2</sup>	31
Destino inadequado das carcaças	14	13 (92,8)	38	34	34	21 <sup>1</sup>	24 <sup>2</sup>
Destino inadequado das vísceras	61	50 (81,9)	31	27	25	18 <sup>1</sup>	20 <sup>2</sup>
<b>Total</b>	<b>92</b>	<b>74 (80,4)</b>	<b>47</b>	<b>43</b>	<b>42</b>	<b>30</b>	<b>33</b>
*Icterohaemorrhagiae		<sup>1</sup> (p<0,01)	<sup>2</sup> (p<0,05)				

261 **Referências**

- 262 ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**,  
263 v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.
- 264 AGUIAR, D. M. C., G.T.; VASCONCELLOS, S.A.; SOUZA, G.O.; LABRUNA, M.B.;  
265 CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. Anticorpos anti-leptospira spp. Em ovinos do  
266 município de monte negro, estado de rondônia. **Arquivo do Instituto de Biologia, São**  
267 **Paulo**, v.3, n.77, p.529-532, 2010.
- 268 ALVES, C. J. A., J. F.; FARIAS, A. E. M.I; HIGINO, S. S. S.; SANTOS, F. A.; AZEVEDO,  
269 S. S.; COSTA, D. F.; SANTOS, C. S. A. B. Caracterização epidemiológica e fatores de risco  
270 associados à leptospirose em ovinos deslanados do semiárido brasileiro. **Pesquisa**  
271 **Veterinária Brasileira**, v.32, 2012.
- 272 ALVES, C. J. A., J.S.L.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; AZEVEDO, S.S.;  
273 SANTOS, F.A. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de  
274 patos-pb, brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.2, p.17-21, 2000.
- 275 ARAÚJO NETO, J. O. A., C. J.; AZEVEDO, S. S.; SILVA, M. L. C. R.; BATISTA, C. S. A.  
276 Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do seridó oriental, estado do rio  
277 grande do norte, brasil, e pesquisa de fatores de risco. **Brazilian Journal of Veterinary**  
278 **Research and Animal Science**, v.47, n.2, p.150-155, 2010.
- 279 AZEVEDO, S. S. Isolation of leptospira spp. From kidneys of sheep at slaughter. **Arquivo do**  
280 **Instituto Biológico**, v.71, p.383-385, 2004.
- 281 CALDAS, E. M. Estudo comparativo entre o teste da macroaglutinação e a soroaglutinação  
282 microscópica, utilizando antígenos de l. Interrogans e l. Biflexa no diagnóstico rápido da  
283 leptospirose em animais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da**  
284 **Bahia**, v.19, n.1, p.155-177, 1998.

- 285 COLE, J. R., JR.; PURSELL, A. R. Serologic incidence of leptospirosis in georgia horses.  
286 **Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc**, n.77, p.632-637, 1973.
- 287 COUSINS, D. V.; ROBERTSON, G. M. Use of enzyme immunoassay in a serological survey  
288 of leptospirosis in sheep. **Aust Vet J**, v.63, n.2, p.36-39, 1986.
- 289 ESCÓCIO, C., GENOVEZ, M.E., CASTRO, V., PIATTI, R.M., GABRIEL, F.H.L.,  
290 CHIEBAO, D.P., AZEVEDO, S.S., VIEIRA, S.R., CHIBA, M. Influência das condições  
291 ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de  
292 sorocaba, sp. **Arqs Inst. Biológico**, v.3, n.77, p.371-379, 2010.
- 293 FAINE, S. A., B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Leptospira and leptospirosis. **MediSci**, v.2,  
294 p.272, 1999.
- 295 FERNANDES, C. E. Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela leptospira  
296 spp. Sorovar hardjo: Fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e  
297 bovinos. **Dissertação de Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o**  
298 **Ambiente, Instituto Biológico de São Paulo**, 2009.
- 299 GALTON, M. M.; SULZER, C. R.; SANTAROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of a  
300 microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Appl Microbiol**, v.13,  
301 p.81-85, 1965.
- 302 GENOVEZ, M. E. E., C; CASTRO, V.; GABRIEL, F. H. L.; CHIEBAO, D. P.; AZEVEDO,  
303 S. S. Fatores de risco associados à infecção pela leptospira spp. Sorovar hardjo em rebanhos  
304 exclusivos de ovinos e nos consorciados com bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**,  
305 v.78, n.4, p.587-592, 2011.
- 306 HATHAWAY, S. C. Experimental infection of the possum (*trichosurus vulpecula*) with  
307 leptospira interrogans serovar balcanica. Ii. A comparison of laboratory techniques for the  
308 detection of leptospiraemia and leptospiruria. **N Z Vet J**, v.29, n.9, p.147-150, 1981.

- 309 HERHOLZ, C. J., T.; STÄRK, K.; GRIOT, C. Patterns of animal diseases and their control.  
310 **Vet Ital**, v.4, n.42, p.295-303, 2006.
- 311 HERRMANN, G. P. L., A.P.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.;  
312 RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Seroprevalence of agglutinins anti-leptospira spp. In sheep  
313 from the southeast and southwest mesoregions of the state of rio grande do sul, brazil.  
314 **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.443-448, 2004.
- 315 HIGINO, S. S. S. A., S.S; ALVES, C.J.; FIGUEIREDO, S. M.; SILVA, M. L. C. R;  
316 BATISTA, C. S. A. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no município de patos,  
317 paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, 2010.
- 318 LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p.296-326, 2001.
- 319 LILENBAUM, W.; DE SOUZA, G. N.; RISTOW, P.; MOREIRA, M. C.; FRAGUAS, S.;  
320 CARDOSO VDA, S.; OELEMANN, W. M. A serological study on brucella abortus, caprine  
321 arthritis-encephalitis virus and leptospira in dairy goats in rio de janeiro, brazil. **Vet J**, v.173,  
322 n.2, p.408-412, 2007.
- 323 LILENBAUM, W.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; CORDEIRO, A. G.; CAVALCANTI, A.;  
324 SOUZA, G. N.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S. A. Risk factors associated with  
325 leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in brazil. **Res Vet Sci**, v.84, n.1, p.14-17,  
326 2008.
- 327 LILENBAUM, W.; VARGES, R.; RISTOW, P.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. O.;  
328 RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Identification of leptospira spp. Carriers  
329 among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Res Vet Sci**, v.87, n.1,  
330 p.16-19, 2009.
- 331 MCKEOWN, J. D.; ELLIS, W. A. Leptospira hardjo agalactia in sheep. **Vet Rec**, v.118, n.17,  
332 p.482, 1986.

- 333 MELO, L. S. S. A ovinocultura e a detecção de aglutininas anti-leptospira em ovelhas no  
334 núcleo rural taquara, distrito federal. **Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Curso**  
335 **de Pós-graduação em Ciências Animais, Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2009.**
- 336 MORAES, C. C. G. G., A.N.; SANTOS, R.B.; SOUZA, V.A.F.; VASCONCELLOS, S.A.;  
337 VASCONCELLOS, S. A. Inquérito sorológico para leptospirose em rebanhos de ovinos no  
338 município de igarapé-açu, estado do pará. **Amazonian Journal of Agricultural and**  
339 **Environmental Sciences**, 2012.
- 340 PAPPEN, F. G. Prevalência de anticorpos para toxoplasma gondii (nicolle e manceaux, 1909)  
341 em ovinos da região sul do estado do rio grande do sul. **Dissertação (Mestrado) – Programa**  
342 **de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas,**  
343 2008.
- 344 PLANK, R. D., D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of  
345 leptospira spp. In humans. **Microbes Infect**, v.2, n.10, p.1265-1276, 2000.
- 346 SALABERRY, S. R. S. C., V.; NASSAR, A. F. C.; CASTRO, J. R.; GUIMARÃES, E. C.;  
347 LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Seroprevalence and risk factors of antibodies against leptospira  
348 spp. In ovinos from uberlândia municipality, minas gerais state, brazil. **Brazilian Journal of**  
349 **Microbiology**, v.42, n.4, 2011.
- 350 SANTA ROSA, C. A. Nove anos de leptospirose no instituto biológico de são paulo. **Revista**  
351 **do Instituto Adolfo Lutz**, v.29, p.19-27, 1969.
- 352 SANTA ROSA, C. A. Presença de aglutininas antileptospiras em soro de ovinos e caprinos no  
353 estado de são paulo. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.30, p.93-98, 1963.
- 354 SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.;  
355 RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.;  
356 HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-

357 like protein liga confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of  
358 leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007.

359 VIEGAS, E. A. Y., R. M; VIEGAS, S. A. R. A.; SILVA, L. A; VASCONCELLOS, S. A.  
360 Emprego de estirpes de leptospira biflexa na prova de soroaglutinação microscópica aplicada  
361 ao diagnóstico da leptospirose caprina e ovina. **Brazilian Journal Veterinary Animal**  
362 **Science**, v.31, n.1, p.25-30, 1994.

363 VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: An emerging  
364 global public health problem. **J Biosci**, v.33, n.4, p.557-569, 2008.



## 5. CONCLUSÕES

Das 92 propriedades incluídas no estudo, 72 (80%) apresentaram animais reagentes, o que representa uma prevalência de 22% na região abrangida, mostrando que *Leptospira* spp. são agentes presentes entre os rebanhos ovinos da mesorregião Sudeste do Rio Grande do Sul. A suplementação da alimentação dos animais com sal mineral está associada a maiores índices de ovinos reagentes para leptospirose.

## 6. REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N. S. B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Leptospirose. **Organización Panamericana de la Salud**, v.2, n.503, p.590-600, 1986.
- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.
- AGUIAR, D. M. C., G.T.; VASCONCELLOS, S.A.; SOUZA, G.O.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. Anticorpos anti-leptospira spp. Em ovinos do município de monte negro, estado de rondônia. **Arquivo do Instituto de Biologia, São Paulo**, v.3, n.77, p.529-532, 2010.
- AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R. A. Development and validation of a real-time pcr for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. **PLoS One**, v.4, n.9, p.e7093, 2009.
- ALVES, C. J. A., J. F.; FARIAS, A. E. M.I; HIGINO, S. S. S.; SANTOS, F. A.; AZEVEDO, S. S.; COSTA, D. F.; SANTOS, C. S. A. B. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à leptospirose em ovinos deslançados do semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, 2012.
- ALVES, C. J. A., J.S.L.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; AZEVEDO, S.S.; SANTOS, F.A. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de patos-pb, brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.2, p.17-21, 2000.
- ARAÚJO NETO, J. O. A., C. J.; AZEVEDO, S. S.; SILVA, M. L. C. R.; BATISTA, C. S. A. Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do seridó oriental, estado do rio grande do norte, brasil, e pesquisa de fatores de risco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.2, p.150-155, 2010.
- AZEVEDO, S. S. Isolation of leptospira spp. From kidneys of sheep at slaughter. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, p.383-385, 2004.
- BOLIN, C. A. A., D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to leptospira borgpetersenii serovar hardjo. **Am J Vet Res**, v.62, n.7, p.995-1000, 2001.
- BOMFIM, M. R.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; KOURY, M. C. Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested pcr. **Vet J**, v.178, n.2, p.251-256, 2008.
- BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas.
- BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.39, p.14560-14565, 2006.
- CALDAS, E. M. Estudo comparativo entre o teste da macroaglutinação e a soroaglutinação microscópica, utilizando antígenos de I. Interrogans e I. Biflexa no diagnóstico rápido da leptospirose em animais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v.19, n.1, p.155-177, 1998.
- CICERONI, L.; LOMBARDO, D.; PINTO, A.; CIARROCCHI, S.; SIMEONI, J. Prevalence of antibodies to leptospira serovars in sheep and goats in alto adige-south tyrol. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v.47, n.3, p.217-223, 2000.

- COLE, J. R., JR.; PURSELL, A. R. Serologic incidence of leptospirosis in georgia horses. **Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc**, n.77, p.632-637, 1973.
- COUSINS, D. V.; ROBERTSON, G. M. Use of enzyme immunoassay in a serological survey of leptospirosis in sheep. **Aust Vet J**, v.63, n.2, p.36-39, 1986.
- CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol Rev**, v.28, n.3, p.291-318, 2004.
- CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an igm-elisa and microscopic agglutination test (mat) in the diagnosis of acute leptospirosis. **Am J Trop Med Hyg**, v.61, n.5, p.731-734, 1999.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; DA SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum Vaccin**, v.7, n.11, p.in press, 2011.
- DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T.; BETHLEM, E. P.; CARVALHO, C. R. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. **Braz J Infect Dis**, v.11, n.1, p.142-148, 2007.
- ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.10, n.3, p.463-478, 1994.
- ESCÓCIO, C., GENOVEZ, M.E., CASTRO, V., PIATTI, R.M., GABRIEL, F.H.L., CHIEBAO, D.P., AZEVEDO, S.S., VIEIRA, S.R., CHIBA, M. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de sorocaba, sp. **Arqs Inst. Biológico**, v.3, n.77, p.371-379, 2010.
- FAINE, S. A., B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Leptospira and leptospirosis. **MediSci**, v.2, p.272, 1999.
- FÁVERO, A. C. M. P., S.R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.613-619, 2002.
- FERNANDES, C. E. Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela leptospira spp. Sorovar hardjo: Fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos. **Dissertação de Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente, Instituto Biológico de São Paulo**, 2009.
- GALTON, M. M.; SULZER, C. R.; SANTAROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Appl Microbiol**, v.13, p.81-85, 1965.
- GENOVEZ, M. E. E., C; CASTRO, V.; GABRIEL, F. H. L.; CHIEBAO, D. P.; AZEVEDO, S. S. Fatores de risco associados à infecção pela leptospira spp. Sorovar hardjo em rebanhos exclusivos de ovinos e nos consorciados com bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.4, p.587-592, 2011.
- GERRITSEN, M. J.; KOOPMANS, M. J.; DEKKER, T. C.; DE JONG, M. C.; MOERMAN, A.; OLYHOEK, T. Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infected cows shedding leptospira interrogans serovar hardjo subtype hardjobovis. **Am J Vet Res**, v.55, n.3, p.339-343, 1994.
- GERRITSEN, M. J.; KOOPMANS, M. J.; PETERSE, D.; OLYHOEK, T. Sheep as maintenance host for leptospira interrogans serovar hardjo subtype hardjobovis. **Am J Vet Res**, v.55, n.9, p.1232-1237, 1994.
- GIRIO, T. M. S. M., F.S.; GIRIO, R.J.S.; MIASHYRO, S.; RODRIGUES, L.H.; SCARCELLI, E.P.; TOMA, S.B. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospirose em touros (bos taurus indicus) naturalmente infectados pelo sorovar hardjo. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.72, n.2, p.161-170, 2005.

- GORIS, M. G. A. L., MARISKA M.G.; BOER, KIMBERLY R.; GOEIJENBIER, MARCO; VAN GORP, ERIC C.M.; WAGENAAR, JIRI F.P.; HARTSKEERL, RUDY A. Establishment of valid laboratory case definition for human leptospirosis. **J Bacteriol Parasitol**, v.3, n.2, 2012.
- GROOMS, D. L. B., C. A. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospira spp. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.21, n.2, p.463-472, 2005.
- HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. **Clin Microbiol Infect**, v.17, n.4, p.494-501, 2011.
- HATHAWAY, S. C. Experimental infection of the possum (*trichosurus vulpecula*) with leptospira interrogans serovar balcanica. li. A comparison of laboratory techniques for the detection of leptospiraemia and leptospiruria. **N Z Vet J**, v.29, n.9, p.147-150, 1981.
- HERHOLZ, C. J., T.; STÄRK, K.; GRIOT, C. Patterns of animal diseases and their control. **Vet Ital**, v.4, n.42, p.295-303, 2006.
- HERRMANN, G. P. L., A.P.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.; RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Seroprevalence of agglutinins anti-leptospira spp. In sheep from the southeast and southwest mesoregions of the state of rio grande do sul, brazil. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.443-448, 2004.
- HERRMANN, L. M.; BASZLER, T. V.; KNOWLES, D. P.; CHEEVERS, W. P. Prp(sc) is not detected in peripheral blood leukocytes of scrapie-infected sheep: Determining the limit of sensitivity by immunohistochemistry. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9, n.2, p.499-502, 2002.
- HIGINO, S. S. S. A., S.S; ALVES, C.J.; FIGUEIREDO, S. M.; SILVA, M. L. C. R; BATISTA, C. S. A. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no município de patos, paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, 2010.
- KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v.7, n.10, p.736-747, 2009.
- LANGONI, H. C., K.G.; SILVA, A.V.; BALDINI, S. Inquérito soropidemiológico para leptospirose suína. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS**, n.7, p.153, 1995.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p.296-326, 2001.
- LILENBAUM, W.; DE SOUZA, G. N.; RISTOW, P.; MOREIRA, M. C.; FRAGUAS, S.; CARDOSO VDA, S.; OELEMANN, W. M. A serological study on brucella abortus, caprine arthritis-encephalitis virus and leptospira in dairy goats in rio de janeiro, brazil. **Vet J**, v.173, n.2, p.408-412, 2007.
- LILENBAUM, W.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; CORDEIRO, A. G.; CAVALCANTI, A.; SOUZA, G. N.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S. A. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in brazil. **Res Vet Sci**, v.84, n.1, p.14-17, 2008.
- LILENBAUM, W.; VARGES, R.; RISTOW, P.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Identification of leptospira spp. Carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Res Vet Sci**, v.87, n.1, p.16-19, 2009.
- MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p.376-386, 2005.
- MCKEOWN, J. D.; ELLIS, W. A. Leptospira hardjo agalactia in sheep. **Vet Rec**, v.118, n.17, p.482, 1986.

- MELO, L. S. S. A ovinocultura e a detecção de aglutininas anti-leptospira em ovelhas no núcleo rural taquara, distrito federal. **Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Curso de Pós-graduação em Ciências Animais, Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2009.**
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, caderno 8, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico /Ministério da Saúde**, 2009.
- MORAES, C. C. G. G., A.N.; SANTOS, R.B.; SOUZA, V.A.F.; VASCONCELLOS, S.A.; VASCONCELLOS, S. A. Inquérito sorológico para leptospirose em rebanhos de ovinos no município de igarapé-açu, estado do pará. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, 2012.
- OOTEMAN, M. C.; VAGO, A. R.; KOURY, M. C. Evaluation of mat, igm elisa and pcr methods for the diagnosis of human leptospirosis. **J Microbiol Methods**, v.65, n.2, p.247-257, 2006.
- PAPPEN, F. G. Prevalência de anticorpos para toxoplasma gondii (nicolle e manceaux, 1909) em ovinos da região sul do estado do rio grande do sul. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.**
- PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of leptospira spp. In humans. **Microbes Infect**, v.2, n.10, p.1265-1276, 2000.
- PRADUTKANACHANA, S.; PRADUTKANACHANA, J.; KHUNTIKIJ, P. Detection of igm specific antibody using indirect immunofluorescent assay for diagnosis of acute leptospirosis. **J Med Assoc Thai**, v.86, n.7, p.641-646, 2003.
- RADDI, G.; MORADO, D. R.; YAN, J.; HAAKE, D. A.; YANG, X. F.; LIU, J. Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic leptospira species revealed by cryo-electron tomography. **J Bacteriol**, v.194, n.6, p.1299-1306, 2012.
- REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A. I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.4, p.228, 2008.
- SALABERRY, S. R. S. C., V.; NASSAR, A. F. C.; CASTRO, J. R.; GUIMARÃES, E. C.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Seroprevalence and risk factors of antibodies against leptospira spp. In ovines from uberlândia municipality, minas gerais state, brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.4, 2011.
- SAMBSIAVA, R. R.; NAVEEN, G.; P, B.; AGARWAL, S. K. Leptospirosis in india and the rest of the world. **Braz J Infect Dis**, v.7, n.3, p.178-193, 2003.
- SANTA ROSA, C. A. Nove anos de leptospirose no instituto biológico de são paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.29, p.19-27, 1969.
- SANTA ROSA, C. A. Presença de aglutininas antileptospiras em soro de ovinos e caprinos no estado de são paulo. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.30, p.93-98, 1963.
- SILVA, E. F.; BROD, C. S.; CERQUEIRA, G. M.; BOURSCHEIDT, D.; SEYFFERT, N.; QUEIROZ, A.; SANTOS, C. S.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Isolation of leptospira noguchii from sheep. **Vet Microbiol**, v.121, n.1-2, p.144-149, 2007.
- SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral

- immunoglobulin-like protein liga confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007.
- SLACK, A. T.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M. F.; CORNEY, B. G.; SMYTHE, L. D. Epidemiology of leptospira weilii serovar topaz infections in australia. **Commun Dis Intell**, v.31, n.2, p.216-222, 2007.
- SMYTHE, L. D.; SMITH, I. L.; SMITH, G. A.; DOHNT, M. F.; SYMONDS, M. L.; BARNETT, L. J.; MCKAY, D. B. A quantitative pcr (taqman) assay for pathogenic leptospira spp. **BMC Infect Dis**, v.2, p.13, 2002.
- SOUZA SEIXAS MELO, L. C., M. B.; LEITE, R. C.; MOREIRA, E. C.; MELO, C. B. Principais aspectos da infecção por leptospira sp em ovinos. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p.1235-1241, 2010.
- SUGUNAN AP, V. P., SEHGAL SC. Evaluation of microscopic agglutination test as a diagnostic tool during acute stage of leptospirosis in high and low endemic areas. **Scientific Meeting**, v.1, n.2, p.2-10, 2002.
- VIEGAS, E. A. Y., R. M; VIEGAS, S. A. R. A.; SILVA, L. A; VASCONCELLOS, S. A. Emprego de estirpes de leptospira biflexa na prova de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose caprina e ovina. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v.31, n.1, p.25-30, 1994.
- VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: An emerging global public health problem. **J Biosci**, v.33, n.4, p.557-569, 2008.
- VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.14, n.5, p.527-538, 2001.
- WANG, M.; LIU, L.; WANG, Y.; WEI, Z.; ZHANG, P.; LI, Y.; JIANG, X.; XU, H.; GONG, W. Crystal structure of homoserine o-acetyltransferase from leptospira interrogans. **Biochem Biophys Res Commun**, v.363, n.4, p.1050-1056, 2007.
- WINTER, A. G. L. Hardjo and lambs receiving cow's colostrum. **The Veterinary Record**, v.124, n.19, p.520, 1989.
- YAN, Y.; CHEN, Y.; LIOU, W.; DING, J.; CHEN, J.; ZHANG, J.; ZHANG, A.; ZHOU, W.; GAO, Z.; YE, X.; XIAO, Y. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. **J Chin Med Assoc**, v.66, n.4, p.224-230, 2003.
- ZUERNER, R. L.; ALT, D. P.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; OLSEN, S. C. A leptospira borgpetersenii serovar hardjo vaccine induces a th1 response, activates nk cells, and reduces renal colonization. **Clin Vaccine Immunol**, v.18, n.4, p.684-691, 2011.

## ANEXO A

### Questionário Epidemiológico

Dados gerais:

Nome da Propriedade: \_\_\_\_\_

Nome do Proprietário: \_\_\_\_\_

Fone contato: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_

Localidade: \_\_\_\_\_

Dados da propriedade:

Área total (ha): \_\_\_\_\_

Área ovinocultura (ha): \_\_\_\_\_

Exploração predominante: ( ) ov ( ) bov ( ) eq ( ) outra \_\_\_\_\_

Outras Explorações: ( ) soja ( ) arroz ( ) outra \_\_\_\_\_

Dados dos ovinos:

Total de ovinos: \_\_\_\_\_

Raça predominante: \_\_\_\_\_

Finalidade principal: ( ) Lã ( ) Corte

Tipo de criação: ( ) Extensiva – sempre soltas

( ) Semi-extensiva – prende à noite ou concentra

( ) Intensiva – sempre presos

Suplementação: ( ) Nada ( ) só sal mineral ( ) ração comercial

Freqüência da suplementação: ( ) Nunca

( ) Eventualmente – inverno, engorda esporádica

( ) Permanentemente

Armazenagem do suplemento: Onde? \_\_\_\_\_

Outros animais (gato, cães, pássaros) tem acesso?

Fonte de água dos ovinos: Qual a principal? \_\_\_\_\_

Como considera a natalidade? ( ) Excelente ( ) Boa ( ) Regular ( ) Ruim

Contato dos ovinos com outros animais:

( ) Bov ( ) Equ ( ) Sui ( ) Cap ( ) Aves domésticas

( ) Cão dom. ( ) quantos

( ) Felino dom. ( ) quantos

( ) Felino silvestre ( ) Felino errante

Destino de carcaças na prop: \_\_\_\_\_

Destino das vísceras (abate): \_\_\_\_\_

Ocorre aborto em ovinos? \_\_\_\_\_

Aborto em outra espécie? \_\_\_\_\_

Cordeiros fracos? \_\_\_\_\_