

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAPHAEL DE OLIVEIRA MENDONÇA

INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Leptospira* sp. EM BÚFALOS
(*Bubalus bubalis*) NO LESTE DA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL.

CURITIBA

2016

RAPHAEL DE OLIVEIRA MENDONÇA

INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Leptospira* sp. EM BÚFALOS
(*Bubalus bubalis*) NO LESTE DA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA
2016

M539 Mendonça, Raphael de Oliveira
Investigação sorológica e molecular de *Leptospira* sp. em
búfalos (*Bubalus bubalis*) no leste da Ilha do Marajó, Pará, Brasil. /
Raphael de Oliveira Mendonça. – Curitiba : 2016.
93 f. il.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

1. Leptospirose em animais. 2. Búfalo - Doenças. I. Molento,
Marcelo Beltrão. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

CDU 619:636.293.2

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Leptospira sp.* EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) NO LESTE DA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL"** apresentada pelo Mestrando **RAPHAEL DE OLIVEIRA MENDONÇA** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 16 de março de 2016

Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento
Presidente/Orientador

Professora Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias
Membro

Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile
Membro

Aos meus pais e irmãos por todo
carinho e apoio.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de estudar e poder desenvolver essa dissertação.

Ao Robson Cruz por todo apoio, carinho e por estar sempre ao meu lado durante o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos meus pais e irmãos por todo o incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos em que estive ausente e por estarem sempre por perto, mesmo a quilômetros de distância!

A professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile por ter me recebido na UFPR e por me apresentar ao meu atual orientador. Obrigado também por todas as dicas e ajuda durante a execução da dissertação.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Beltrão Molento, por aceitar me orientar, acreditar no meu trabalho e por toda ajuda e apoio no desenvolvimento desse projeto.

Muito obrigado ao médico veterinário Loreno da Costa Francez e seus estagiários por todo auxílio com a logística, hospedagem e principalmente por todo empenho na colheita das amostras na Ilha da Marajó. Obrigado também por nos receber no Abatedouro Municipal de Soure, assim como a todos os funcionários envolvidos.

A professora Dra. Elane Guerreiro Giese, co-responsável pelo projeto Pró-Amazônia, por me receber em sua própria casa durante as idas para Belém, disponibilizar sua equipe para auxiliar na execução do projeto, além de toda a organização e empenho nas colheitas de amostras.

Ao professor Dr. Hélio Langoni por me receber e permitir que parte do meu projeto fosse realizado no NUPEZO – UNESP – Botucatu.

Um agradecimento especial a todos os veterinários residentes e estagiários do NUPEZO, em especial a residente Sâmea Fernandes Joaquim por toda amizade, carinho e ajuda, além de estar sempre disposta a tirar minhas dúvidas e auxiliar na execução das sorologias e diagnóstico molecular.

Ao professor Dr. Amilcar Arenal Cruz pelo auxílio na execução da PCR e por todos os ensinamentos.

A professora Dra. Edneia Cavalieri, por todo auxílio com o diagnóstico por PCR e todas as dicas durante a execução do projeto.

A doutoranda Luciana L. Dias de Castro por toda ajuda desde o início do mestrado: nas disciplinas, na parte prática dos experimentos, na escrita da dissertação, por todos os ensinamentos, apoio moral e amizade ao longo desses dois anos.

A toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias – UFPR.

Muito obrigado!

“É necessário fazer outras perguntas, ir atrás das indagações que produzem o novo saber, observar com outros olhares através da história pessoal e coletiva, evitando a empáfia daqueles e daquelas que supõem já estar de posse do conhecimento e da certeza.”

Mario Sergio Cortella

RESUMO

A leptospirose é um problema de saúde pública mundial, sendo uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Esta enfermidade possui grande importância para a produção animal, pois pode comprometer a sanidade do rebanho, causar problemas reprodutivos e queda na produção com consequentes impactos econômicos negativos. A bubalinocultura no Brasil é uma prática rentável, além de estar em plena expansão. Os búfalos são suscetíveis a diversas enfermidades infecciosas que podem comprometer a sanidade do rebanho, causando prejuízos econômicos ao produtor, além de oferecer riscos a saúde pública. Dessa forma, estudos sobre doenças que acometem os bubalinos são essenciais para determinar medidas sanitárias específicas. A Ilha do Marajó possui o maior rebanho de bubalinos do Brasil, refletindo a importância de estudos da epidemiologia da leptospirose na região. A soroaglutinação microscópica (SAM) é a técnica considerada padrão ouro e detecta anticorpos contra diversos sorovares de *Leptospira* sp. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de diagnóstico direto, rápido e atende aos requisitos de especificidade e sensibilidade. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi comparar as técnicas de soroaglutinação microscópica (SAM) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de rim, fígado, sangue total e urina no diagnóstico de *Leptospira* sp. em búfalos na Ilha do Marajó. Em um primeiro estudo foram coletadas 212 amostras de soro e 140 amostras de sangue total de búfalos provenientes de 21 propriedades dos municípios de Salvaterra, Soure, Cachoeira do Arari e Muaná, localizados na Ilha do Marajó, Pará. Todas as amostras de sangue total foram negativas pela técnica de PCR, pela técnica de SAM 20,75% (44/212) dos animais foram positivos e 76,19% (16/21) das propriedades apresentaram ao menos um animal reagente. Os sorovares mais prevalentes foram Pomona (40%) e Hardjo CTG (26%) e o maior título encontrado (800) foi destes sorovares. Em um segundo estudo foram analisadas através das mesmas técnicas amostras de soro, sangue total, rim e fígado e urina, esses materiais foram provenientes de búfalos abatidos em um frigorífico no município de Soure. Das amostras de soro 45% (18/40) foram reagentes na técnica de SAM e os sorovares mais prevalentes foram Pomona (31,6%) e Hardjo CTG (31,6%). Na PCR 32,5% (13/40) das amostras foram positivas, sendo 10 amostras do rim, duas amostras do rim e fígado simultaneamente e apenas uma do fígado. Todas as amostras de sangue total e urina foram negativas. As análises das duas técnicas em conjunto, bem como o uso da PCR nas diferentes amostras, permitiram identificar a provável fase de infecção em que se encontravam os animais, além de ressaltar a importância do uso dessas técnicas de forma complementar no diagnóstico da leptospirose. Os resultados obtidos comprovam a participação dos búfalos no ciclo epidemiológico da leptospirose, inclusive como portadores renais do agente.

Palavras-chave: Leptospirose, bubalinos, soroaglutinação microscópica, PCR.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide public health problem and is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Leptospira*. This disease is very important for livestock production because it can compromise the health of the herd, cause reproductive problems and decline in production with consequent negative economic impacts. The buffalo raising in Brazil is a profitable practice, besides being in full expansion. Buffaloes are susceptible to a variety of infectious that can compromise the health of the herd, causing economic losses to the producer, besides offering risks to public health. Thus, studies on diseases that affect buffaloes are essential to determine specific sanitary measures. The Marajó Island has the largest buffalo herd in Brazil, highlighting the importance of leptospirosis epidemiology studies in the region. The microscopic agglutination test (MAT) is considered the gold standard technique and detects antibodies against a variety *Leptospira* sp. serovars. The polymerase chain reaction (PCR) is a direct diagnostic method, fast and complies with requirements of specificity and sensitivity. Therefore, the aim of this study was to compare the techniques of microscopic agglutination test (MAT) and polymerase chain reaction (PCR) in samples of kidney, liver, whole blood and urine in the diagnosis of *Leptospira* sp. in buffaloes Marajó Island. In a first study were collected 212 serum samples and 140 whole blood samples of buffalo from 21 properties from the municipalities of Salvaterra, Soure, Cachoeira do Arari and Muana, located on the Marajó Island, Pará. All whole blood samples were negative by PCR technique, for the SAM technique 20.75% (44/212) of the animals were positive and 76.19% (16/21) of the properties presented at least one reagent animal. The most prevalent serovars were Pomona (40%) and Hardjo CTG (26%) and the highest titer found (800) was of these serovars. In a second study were analyzed by the same techniques samples of serum, whole blood, kidney, liver and urine, these materials were obtained from slaughtered buffalo in the municipality of Soure. In serum samples 45% (18/40) were reactants to SAM technique and the most prevalent serovars were Pomona (31.6%) and Hardjo CTG (31.6%). In PCR 32.5% (13/40) of the samples were positive, with 10 samples from kidney, two samples from kidney and liver simultaneously, and only one from liver. All samples of whole blood and urine were negative. The analyzes of the two techniques together, as well as the use of PCR in the different samples, allowed to identify the probable stage of infection in which the animals were, in addition to highlighting the importance of using these techniques in the diagnosis of leptospirosis. The results confirm the participation of buffaloes in the epidemiological cycle of leptospirosis, even as kidney agent carriers.

Keywords: Leptospirosis, buffaloes, microagglutination test, PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição de 256 casos de leptospirose canina em um período de 10 anos (2003-2012) de animais provenientes da Suíça e a correspondência com curvas de temperatura e índice pluviométrico. Fonte: Adaptado de MAJOR et al. (2014).23
- Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura de dois espécimes de *Leptospira interrogans*. Fonte: Public Health Image Library CDC/NCID26
- Figura 3 - Cronologia da infecção por *Leptospira* sp. de acordo com os diferentes estados imunológicos do hospedeiro. Fonte: SANTOS, 2014 (Adaptado de GREENE et al.,2006)29
- Figura 4 - Representação esquemática das fases aguda e crônica da leptospirose. Fonte: Adaptado de LEVETT (2001).....31
- Figura 5 - Localização da Ilha da Marajó – PA e municípios estudados.46
- Figura 6 - Localização do município de Soure na Ilha do Marajó – PA, Brasil.67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ocorrência de *Leptospira* sp., por municípios e propriedades, em amostras de soro utilizando a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e sangue pela técnica de PCR em búfalos provenientes da Ilha do Marajó, Pará.51

TABELA 2 - Distribuição de títulos de anticorpos e sorovares pelo teste de soro aglutinação microscópica em amostras reagentes para *Leptospira* sp. em búfalos provenientes da Ilha do Marajó, Pará, Brasil, 2015.54

TABELA 3 - Resultado da soroaglutinação microscópica para *Leptospira* sp. segundo a faixa etária em anos de búfalos provenientes da Ilha do Marajó, Pará, 2015.56

TABELA 4 - Resultado da soroaglutinação microscópica (SAM) para *Leptospira* sp. segundo o sexo de búfalos provenientes da Ilha do Marajó, Pará, 2015.57

TABELA 5 - Distribuição de títulos de anticorpos e sorovares pelo teste de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras reagentes para *Leptospira* sp. em búfalos provenientes de abatedouro no município de Soure, Pará, Brasil, 2015.71

TABELA 6 - Resultado dos 23 búfalos positivos para *Leptospira* sp. em pelo menos uma das amostras de rim e fígado pela técnica de PCR ou amostra de soro utilizando a técnica de SAM.72

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Antígenos de *Leptospira* sp. utilizados na técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM).48

QUADRO 2 - Antígenos de *Leptospira* sp. utilizados na técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em amostras provenientes de búfalos do município de Soure, Ilha do Marajó, Pará.....69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

et al. – e colaboradores

EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KCl – cloreto de potássio

mM – milimolar

MgCl₂ – cloreto de magnésio

PA – Pará

pb – par de bases

PBS – Solução Salina Tamponada de Fosfatos

PCR – Reação em cadeia da polimerase

rpm – rotações por minuto

SAM – Soroaglutinação microscópica

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UNESP – Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 HIPÓTESE.....	18
1.2 OBJETIVO GERAL.....	18
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2. BUBALINOCULTURA E ASPECTOS DA LEPTOSPIROSE – REVISÃO DE LITERATURA.	20
2.1 INTRODUÇÃO.....	22
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	23
2.3 ETIOLOGIA.....	25
2.4 VIAS E FONTES DE INFECÇÃO	26
2.5 SINAIS CLÍNICOS	27
2.6 DIAGNÓSTICO.....	30
2.7 CONTROLE E PROFILAXIA.....	34
2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36
3. OCORRÊNCIA DE <i>Leptospira</i> SP. EM BÚFALOS (<i>Bubalus bubalis</i>) NA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL.....	42
3.1 INTRODUÇÃO.....	44
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.2.1 Área do Estudo	46
3.2.2 Animais experimentais	47
3.2.3 Colheita de amostras.....	47
3.2.4 Soroaglutinação Microscópica	47
3.2.5 Reação em cadeia da polimerase	49
3.2.6 Análise Estatística	50
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.4 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59
4. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE <i>Leptospira</i> sp. EM BÚFALOS (<i>Bubalus bubalis</i>) ABATIDOS EM FRIGORÍFICO, PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE SOURE NA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL.	62
4.1 – INTRODUÇÃO.....	64
4.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.2.2 Área do estudo.....	67
4.2.3 Colheita de amostras.....	68
4.2.4 Soroaglutinação Microscópica	68
4.2.5 Reação em cadeia da polimerase	70
4.3 – RESULTADOS	71
4.3.1 – Soroaglutinação microscópica.....	71
4.3.2 – PCR para <i>Leptospira</i> sp.....	71
4.3.3 – Relação entre as técnicas e as diferentes amostras utilizadas.....	72

4.4 – DISCUSSÃO.....	73
4.5 – CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS	80
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
7. ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose foi descrita pela primeira vez em 1886 por Adolf Weil, na Alemanha, como uma doença causadora de icterícia e falência renal. Anteriormente, em 1881, Weiss descreveu uma doença que causava icterícia no homem, porém sem a identificação do agente etiológico. A enfermidade passou a ter o nome de doença de Weil (LEVETT, 2001). No Brasil a leptospirose foi descrita pela primeira vez no ano de 1917 por McDowel e nesse mesmo ano a bactéria foi identificada em um estudo com seis roedores da espécie *Rattus norvegicus* (JOUGLARD, 2005).

Causada por bactérias do gênero *Leptospira*, a leptospirose é um problema de saúde pública mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais úmidas, onde se localizam a maioria dos países em desenvolvimento. Quando comparado a países de clima temperado, o problema nessas regiões é maior, não somente pelas questões ambientais e climáticas, mas também pelas condições precárias de habitação e saneamento (WHO, 2003).

A transmissão ocorre por meio da interação entre humanos e mamíferos hospedeiros. Pode ser adquirida por meio do contato direto ou ambiente contaminado com a urina dos animais reservatórios (VINETZ, 2001). Os reservatórios são os animais sinantrópicos, domésticos e silvestres, que são essenciais para a persistência dos focos de infecção. Os seres humanos são hospedeiros acidentais terminais, dentro da cadeia de transmissão (BRASIL, 2005).

Espécies de roedores (ordem Rodentia) são conhecidos como potenciais disseminadores dos diferentes sorovares de leptospirosas (CORRÊA, 2007), sendo importantes reservatórios da infecção, tanto para humanos quanto para animais domésticos (VANASCO et al., 2003). Em áreas urbanas, os cães são considerados importantes transmissores da leptospirose aos humanos, pois podem eliminar leptospirosas na urina por vários meses sem apresentar sinais clínicos (BATISTA et al., 2004).

A leptospirose é uma doença altamente difundida, ocorrendo aproximadamente 500 mil casos em humanos por ano (WHO, 2011). O Brasil está entre os 28 países com

maior incidência anual de leptospirose humana, ocupando a 17ª posição (PAPPAS et al., 2008). No período de janeiro de 2000 a dezembro de 2010, foram confirmados 37.824 casos da doença, com média anual de 3.438 casos. O total de óbitos confirmados neste período foi de 4.029 sendo a letalidade média de 10,7%. Neste período, os casos se concentraram nos estados das regiões Sudeste e Sul, que representaram 69,1% dos casos do país, seguidos pelos estados da região Nordeste (20,4%), Norte (9,0%) e Centro-Oeste (1,5%) (BRASIL, 2011).

A leptospirose é uma zoonose de grande importância para a produção animal, podendo comprometer a higidez do rebanho, causar problemas reprodutivos e queda na produção com consequentes impactos econômicos negativos (WHO, 2003).

A bubalinocultura no Brasil é uma prática rentável, além de estar em plena expansão. Os búfalos são animais rústicos e resistentes, porém suscetíveis a diversas enfermidades infecciosas que podem comprometer a sanidade do rebanho e causar prejuízos econômicos. Dessa forma, estudos sobre doenças que acometem os bubalinos são essenciais para determinar medidas sanitárias específicas (BERNARDES, 2007). De acordo com dados da Pesquisa da Produção Pecuária Municipal (IBGE, 2012) o estado do Pará possui aproximadamente 485.033 cabeças de bubalinos, sendo que 64% (311.664) desse efetivo se encontra na Ilha do Marajó que possui o maior rebanho dessa espécie no Brasil.

O estudo da epidemiologia da leptospirose se faz necessário, pois reflete a relação ecológica entre humanos e mamíferos reservatórios cronicamente infectados (VINETZ, 2001). Existe grande variação nas diversas regiões do mundo em relação aos hospedeiros e aos sorovares de leptospira que carregam, sendo de extrema importância o conhecimento dos sorovares prevalentes e de seus hospedeiros de manutenção em cada uma dessas regiões (LEVETT, 2001). No Brasil a ocorrência da leptospirose em bubalinos varia conforme a região estudada. CARVALHO et al. (2015) em estudo com búfalos provenientes do estado do Maranhão, região nordeste, utilizaram a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) e encontraram 70,58% de animais positivos. Já FAVERO et al. (2002) e LANGONI et al. (1999), ambos no estado de São Paulo na região sudeste e utilizando a mesma técnica, encontraram 43,7% e 37,7% de ocorrência, respectivamente.

A técnica de diagnóstico recomendada pela Organização Mundial da Saúde é a soroprecipitação microscópica (SAM). Considerada padrão ouro, essa técnica detecta anticorpos contra diversos sorovares de *Leptospira* sp. Entretanto, a soroprecipitação microscópica possui algumas desvantagens, tais como a detecção de anticorpos apenas entre 5 e 10 dias após a infecção, não indica infecção ativa, portadores podem apresentar títulos abaixo dos níveis detectáveis, não distingue títulos altos causados pela vacinação e a potencial ocorrência de reações cruzadas na fase inicial da doença (WHO, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de diagnóstico direto, rápido e atende aos requisitos de especificidade e sensibilidade, podendo ser utilizado em amostras clínicas como sangue, urina e tecidos (MERIEN et al., 1992). Essa técnica, embora não seja capaz de identificar os sorovares infectantes, é uma importante ferramenta para o diagnóstico da leptospirose (LEVETT, 2001).

Nesse sentido, se faz necessário a identificação de novas e/ou complementares técnicas diagnósticas para a leptospirose. A importância relatada à técnica de soroprecipitação microscópica (SAM) bem como a aplicabilidade da técnica de PCR em amostras de sangue, rim, fígado e urina no diagnóstico de *Leptospira* sp. em búfalos na Ilha do Marajó poderia auxiliar o entendimento da participação dos búfalos no ciclo epidemiológico da bactéria.

1.1 HIPÓTESE

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) participam do ciclo epidemiológico da leptospirose na região geográfica do estudo.

1.2 OBJETIVO GERAL

Determinar a ocorrência de *Leptospira* sp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha do Marajó, Pará, Brasil.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a ocorrência de *Leptospira sp.* em búfalos (*Bubalus bubalis*) nos municípios de Salvaterra, Soure, Cachoeira do Arari e Muaná por meio das técnicas de SAM e PCR.
- b) Verificar a ocorrência de *Leptospira sp.* em búfalos sorologicamente positivos e negativos, utilizando a técnica de PCR em amostras de rim, fígado, sangue e urina, em animais provenientes de abatedouro no município de Soure.
- c) Comparar os resultados entre a Soroaglutinação Microscópica (SAM) e a técnica de PCR para *Leptospira sp.* a partir de fragmentos de rim e fígado, sangue e urina de búfalos.

2. BUBALINOCULTURA E ASPECTOS DA LEPTOSPIROSE – REVISÃO DE LITERATURA.

RESUMO

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) são encontrados em diversos estados brasileiros, sendo a bubalinocultura amplamente difundida na região norte, principalmente na Ilha do Marajó que possui o maior rebanho dessa espécie no Brasil. A criação de búfalos se tornou uma alternativa viável e economicamente rentável para a produção de carne, leite e ainda como animais de trabalho. Com o crescimento da produção bubalina, a preocupação com o manejo sanitário tem aumentado, pois aspectos clínicos, diagnósticos e epidemiológicos ainda são pouco estudados nessa espécie, sendo muitas vezes baseados em procedimentos utilizados em bovinos. A bubalinocultura pode ser afetada por uma grande variedade de enfermidades que causam prejuízos econômicos, além disso, muitas dessas doenças são zoonoses de importância para a saúde pública. A leptospirose, causada por uma bactéria espiroqueta do gênero *Leptospira*, é uma zoonose de ocorrência mundial e possui grande importância tanto para a saúde pública, quanto para a produção animal. Ocasiona distúrbios reprodutivos, tais como repetições de cio, nascimento de animais debilitados e abortamentos, gerando impactos econômicos negativos. A soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste sorológico de referência no diagnóstico laboratorial da leptospirose, entretanto técnicas moleculares têm sido utilizadas para o diagnóstico rápido e precoce da doença. Animais domésticos, silvestres e sinantrópicos podem se tornar reservatórios da doença, eliminando leptospirosas vivas na urina, independente da presença ou ausência de sinais clínicos. O estudo da epidemiologia da leptospirose é importante para entender a relação entre o homem e os mamíferos reservatórios. Os inquéritos sorológicos regionais são necessários devido a grande variação nas diversas regiões do mundo em relação aos hospedeiros e aos sorovares de *Leptospira* sp. que carregam.

Palavras-chave: bubalinocultura, soroaglutinação microscópica, leptospirose.

BUFFALOES PRODUCTION AND ASPECTS OF LEPTOSPIROSIS - LITERATURE REVIEW.

ABSTRACT

Buffaloes (*Bubalus bubalis*) are found in several Brazilian states, mainly in the northern region. The Marajo Island has the largest herd of this species in Brazil. The raising of water buffalo became a viable and cost-effective alternative for the production of meat, milk and also as working animals. With the growth of buffalo production, concerns for their health management has increased. Clinical, diagnostic and epidemiological aspects are still poorly studied in this species, and are often based on procedures used in cattle. Water buffaloes herds can be affected by a wide variety of diseases, which cause economic losses moreover many of these diseases are important zoonosis to public health. Leptospirosis, caused by a bacterium of the genus *Leptospira*, is a worldwide zoonotic disease and has great importance for public health and for livestock production. Microagglutination test (MAT) is the reference test for leptospirosis diagnosis, however molecular techniques have been used for the rapid and early diagnosis. Domestic, wild and synanthropic animals can become reservoirs of disease, eliminating live *Leptospira* in urine, regardless of the presence or absence of clinical signs. The study of the epidemiology of leptospirosis in buffaloes is important to understand the relationship between man and the large mammal reservoir. Thus, regional serological surveys in Marajo Island are required to understand the wide variation in the different regions of the world in relation to hosts and the serovars of *Leptospira* sp.

Keywords: water buffaloes, leptospirosis, microagglutination test.

2.1 INTRODUÇÃO

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) foram introduzidos no Brasil a partir do final do século XIX, na Ilha do Marajó que pertence ao estado do Pará. Altamente adaptáveis, se multiplicaram com rapidez, sendo atualmente encontrados em todos os estados brasileiros, constituindo o maior rebanho do ocidente (BERNARDES, 2007).

São animais domésticos de origem asiática que pertencem a família dos bóvidos. No Brasil, são reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos quatro raças: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Carabao (ABCB, 2015). Segundo a Pesquisa da Produção Pecuária Municipal (IBGE, 2012), o Brasil conta com 1.277.199 cabeças de bubalinos em seu território sendo que aproximadamente 38% (485.033) desse efetivo se encontra no estado do Pará, divididos em 4.502 propriedades. A ilha do Marajó possui aproximadamente 64% (311.664) do rebanho bubalino do estado do Pará, sendo o maior rebanho dessa espécie no Brasil.

A bubalinocultura está ganhando destaque no cenário nacional como uma alternativa economicamente rentável. São animais rústicos, adaptando-se as mais diversas condições climáticas e podem ser utilizados para produção de leite, carne e couro, além de serem utilizados também como animais de trabalho (SILVA et al, 2003). A produção de bubalinos pode ser afetada por uma grande variedade de doenças que causam impacto negativo na reprodução. Os búfalos possuem hábito gregário que, associado a práticas de manejo inadequadas, propicia a transmissão de agentes etiológicos entre os animais do rebanho (CORREA, 2011). As enfermidades de origem infecciosa podem ser transmitidas também para o ser humano, gerando graves problemas de saúde pública (GIRALDO et al, 2014). Com isso, a preocupação com o manejo sanitário dessa espécie tem aumentado, pois aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos ainda são pouco estudados no país (SILVA et. al., 2013) e os procedimentos para diagnóstico, tratamento e controle de doenças nesses animais ainda são baseados em procedimentos utilizados em bovinos (MATHIAS et al., 1998)

A leptospirose é uma zoonose de grande importância, tanto para a saúde pública, quanto para a produção animal, podendo comprometer a higidez do rebanho,

causar problemas reprodutivos e queda na produção com consequentes impactos econômicos negativos (WHO, 2003).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é uma antropozoonose amplamente difundida no mundo. Ocorre tanto em ambientes urbanos quanto rurais, em países de clima tropical, subtropical ou temperado. Entretanto, sua incidência é maior em países ou regiões de clima tropical, possuindo caráter sazonal coincidindo com a estação chuvosa do ano (LEVETT, 2001). Essa maior incidência também ocorre devido a maior capacidade de sobrevivência das leptospiros em condições ambientais úmidas e quentes (WHO, 2003). MAJOR et al. (2014) correlacionaram o aumento no número de casos agudos de leptospirose por mês com os aumentos da temperatura média mensal e média do índice pluviométrico, em estudo com 256 cães provenientes da Suíça em um período de dez anos, evidenciando a importância desses animais no uso como modelo para a infecção humana e de outros animais (Figura 1).

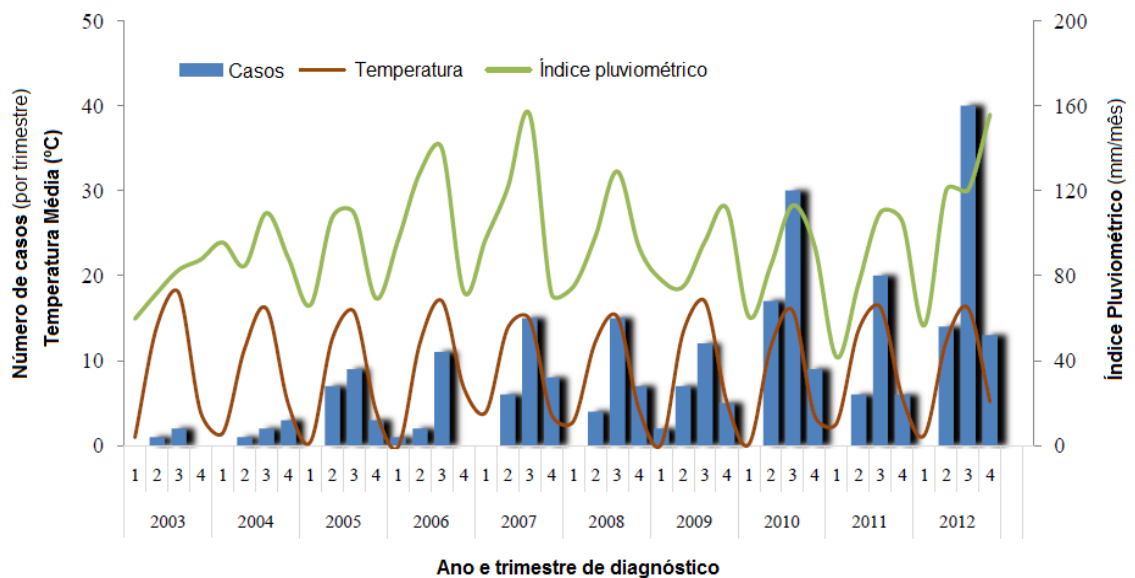


Figura 1 - Distribuição de 256 casos de leptospirose canina em um período de 10 anos (2003-2012) de animais provenientes da Suíça e a correspondência com curvas de temperatura e índice pluviométrico. Fonte: Adaptado de MAJOR et al. (2014).

A água desempenha um importante papel na transmissão da leptospirose, carreando o agente para locais onde estão presentes indivíduos suscetíveis. Dessa forma, a ocorrência da leptospirose está estreitamente relacionada ao ambiente. Terrenos alagadiços, águas de enchente e reservatórios de água doce são favoráveis a sobrevivência das leptospiras que apresentam sobrevida longa nesses locais (ACHA; SZYFRES, 2003; KO et al., 1999). O padrão extensivo de criação de bubalinos, assim como o acesso desses animais a diversos ecossistemas e o hábito da espécie em banhar-se em rios, riachos e áreas alagadas são os principais fatores de risco para a infecção por leptospiras (NARDI et al., 2007).

A expansão urbana desordenada e o saneamento básico precário constituem fatores essenciais para a proliferação de roedores. Águas contaminadas com leptospiras, eliminadas por roedores infectados, são importantes fontes de infecção, tanto para humanos quanto para animais. Dessa forma, os grupos socioeconômicos menos privilegiados, que habitam moradias precárias em áreas urbanas periféricas, com esgoto a céu aberto e expostos a enchentes apresentam grande risco de contrair a doença (ALMEIDA et al., 1994). No Brasil a doença é considerada epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e regiões metropolitanas devido as enchentes associadas à aglomeração das populações de baixa renda. No ano de 2015 foram confirmados mais de 3500 casos de leptospirose humana em todo o país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O agente infectante é transmitido de um mamífero infectado para outro, de forma direta ou indireta, através de lesões na pele, mucosas oral, nasal ou conjuntiva. A forma mais comum de infecção ocorre através do contato com água, solo ou alimentos contaminados com urina de animais infectados contendo leptospiras viáveis (ACHA; SZYFRES, 2003).

Epidemiologicamente, a leptospirose ocorre no homem, animais domésticos e silvestres de duas formas: a primeira é quando o animal é infectado com um sorovar adaptado a sua espécie e torna-se reservatório sem a manifestação de sinais clínicos. A segunda é quando o animal se infecta com sorovares não adaptados a sua espécie, causando a doença com manifestações clínicas. A segunda forma é a mais comum em humanos (HEATH; JOHNSON, 1994).

O estudo da epidemiologia da leptospirose se faz necessário, pois reflete a relação ecológica entre humanos e mamíferos reservatórios cronicamente infectados (VINETZ, 2001). Existe grande variação nas diversas regiões do mundo em relação aos hospedeiros e aos sorovares de leptospira que carregam, sendo de extrema importância o conhecimento dos sorovares prevalentes e de seus hospedeiros de manutenção em cada uma dessas regiões e em cada rebanho afetado (LEVETT, 2001). No Brasil existem diferenças conforme a região estudada, DIAS et al. (2014) em pesquisa com 120 rebanhos bubalinos provenientes de municípios do estado do Pará na região norte, encontraram 85,4% de prevalência utilizando a SAM e o sorovar mais prevalente foi Hardjo, já FAVERO et al. (2002) em estudo com búfalos do estado de São Paulo na região sudeste, encontraram 43,7% de prevalência, também utilizando a SAM, com o sorovares Hardjo e Pomona sendo os mais prevalentes.

2.3 ETIOLOGIA

A leptospirose é causada por uma bactéria espiroqueta do gênero *Leptospira*, que pertence à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (Figura 1). De acordo com a classificação taxonômica clássica, o gênero *Leptospira* é dividido em duas espécies: *L. interrogans*, que compreende todas as leptospiros patogênicas e *L. biflexa*, que são as leptospiros saprófitas isoladas do ambiente. Ambas espécies são divididas em diversos sorovares (ou variantes sorológicas) definidos por aglutinação de anticorpos utilizando o teste de soroaglutinação microscópica (LEVETT, 2001). Sorovares com similaridades antigênicas foram agrupados em sorogrupos. São descritos mais de 250 sorovares patogênicos que estão distribuídos em 25 sorogrupos (WHO, 2003).

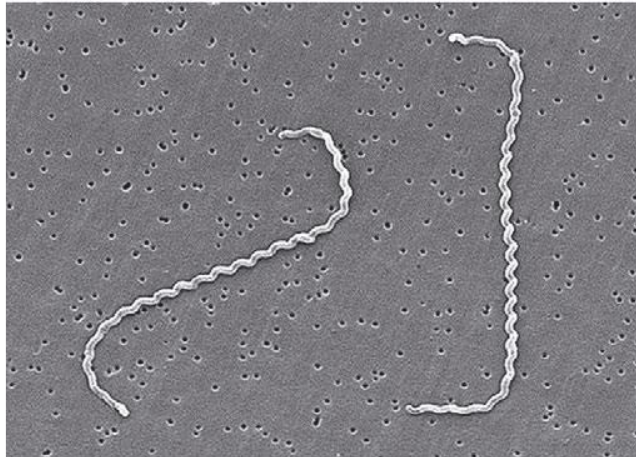


Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura de dois espécimes de *Leptospira interrogans*. Fonte: Public Health Image Library CDC/NCID

Atualmente o gênero *Leptospira* é classificado de acordo com o seu genoma. De acordo com essa classificação existem 13 espécies patogênicas: *Leptospira alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffi*, com mais de 260 sorovares, existindo ainda a possibilidade de espécies novas. As espécies saprófitas são: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii*, com mais de 60 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

De acordo com essa nova classificação alguns sorovares patogênicos e não patogênicos podem ocorrer dentro de uma mesma espécie de leptospira. Não existe correspondência entre a antiga classificação sorológica e a classificação genotípica, sendo essa última um problema para clínicos e epidemiologistas por ser incompatível com o sistema de sorogrupos, que deve ser mantido, até que um sistema de identificação genética mais simples seja desenvolvido e validado (LEVETT, 2001; WHO, 2003).

2.4 VIAS E FONTES DE INFECÇÃO

As leptospirosas patogênicas são mantidas na natureza nos túbulos renais dos animais portadores causando pouco ou nenhum sinal clínico e, portanto, eles são conhecidos como hospedeiros naturais de manutenção ou reservatórios (WHO, 2003).

Os portadores podem ser animais selvagens ou domésticos, especialmente roedores, pequenos marsupiais e cães (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Roedores sinantrópicos são importantes fontes para a infecção humana e outros animais. Isso ocorre devido ao seu grande número, proximidade com o homem e com os animais domésticos e por albergarem a bactéria nos rins eliminando-as vivas no ambiente durante toda a vida do animal, contaminando as águas, o solo e os alimentos. Das espécies sinantrópicas comensais, isto é, que dependem unicamente do ambiente humano, a ratazana (*Rattus norvegicus*), o rato de telhado (*Rattus rattus*), e o camundongo (*Mus musculus*), são responsáveis pela maior parte dos prejuízos econômicos e sanitários causados ao homem (BRASIL, 2005).

Em propriedades rurais, os animais silvestres podem atuar como fonte de disseminação e manutenção das leptospiros no ambiente, pois devido a grande oferta de alimentos, esses animais convivem muito próximos aos animais de produção. Essa convivência próxima pode ocorrer devido ao desmatamento para formação de novas pastagens (CHIEBAO, 2010). Os bovinos também podem ser responsáveis pela manutenção das bactérias nas propriedades, podendo ocorrer a presença de animais doentes ou assintomáticos, sendo considerados importantes disseminadores da doença para humanos e outros animais (FAINE et al., 1999; VASCONCELLOS, 1997).

As leptospiros patogênicas são excretadas na urina desses animais, de forma intermitente ou contínua, podendo sobreviver em terrenos úmidos, pântanos, córregos, lagos, áreas alagadas e outros locais com excesso de umidade por um longo período de tempo (WASINSKI; DUTKIEWICZ, 2013). Animais suscetíveis adquirem a doença por contato direto ou indireto com a urina ou tecido de animais infectados (BHARTI et al., 2003).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

A infecção é dividida basicamente em duas fases: aguda e crônica (ou convalescente). A leptospira penetra no organismo nos pequenos ferimentos cutâneos, mucosas ou ainda na pele úmida e se dissemina na corrente sanguínea. A partir desse momento se estabelece a fase aguda conhecida como leptospiremia que pode durar de sete a 10 dias. As leptospiros são capazes de se multiplicar em inúmeros tecidos,

principalmente o baço, os pulmões e o fígado. Após o número de leptospiras no sangue e nos tecidos atingirem níveis críticos, surgem lesões decorrentes das toxinas leptospirais e os sinais clínicos se manifestam (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Após essa fase inicial os mecanismos imunológicos do hospedeiro reduzem a quantidade de leptospiras na circulação e elas ficam em maior concentração, quase restritas aos tecidos, principalmente nos rins onde ficam aderidas no epitélio dos túbulos renais, se multiplicando e sendo eliminadas na urina. Essa etapa caracteriza a fase de leptospirúria (LEVETT, 2001). Nessa fase ocorre um aumento da concentração de anticorpos circulantes e determinados animais domésticos ou silvestres podem se tornar hospedeiros de manutenção, excretando leptospiras vivas na urina de forma intermitente por vários anos ou mesmo por toda a vida (WHO, 2003). Uma espécie animal que serve como hospedeiro de manutenção para um determinado sorovar de leptospira, pode se tornar hospedeiro acidental para outro sorovar, resultando em doença grave e muitas vezes fatal (KO et al., 2009). A figura 3 sintetiza a cronologia das principais etapas da patogênese em relação aos diferentes níveis de anticorpos no hospedeiro.

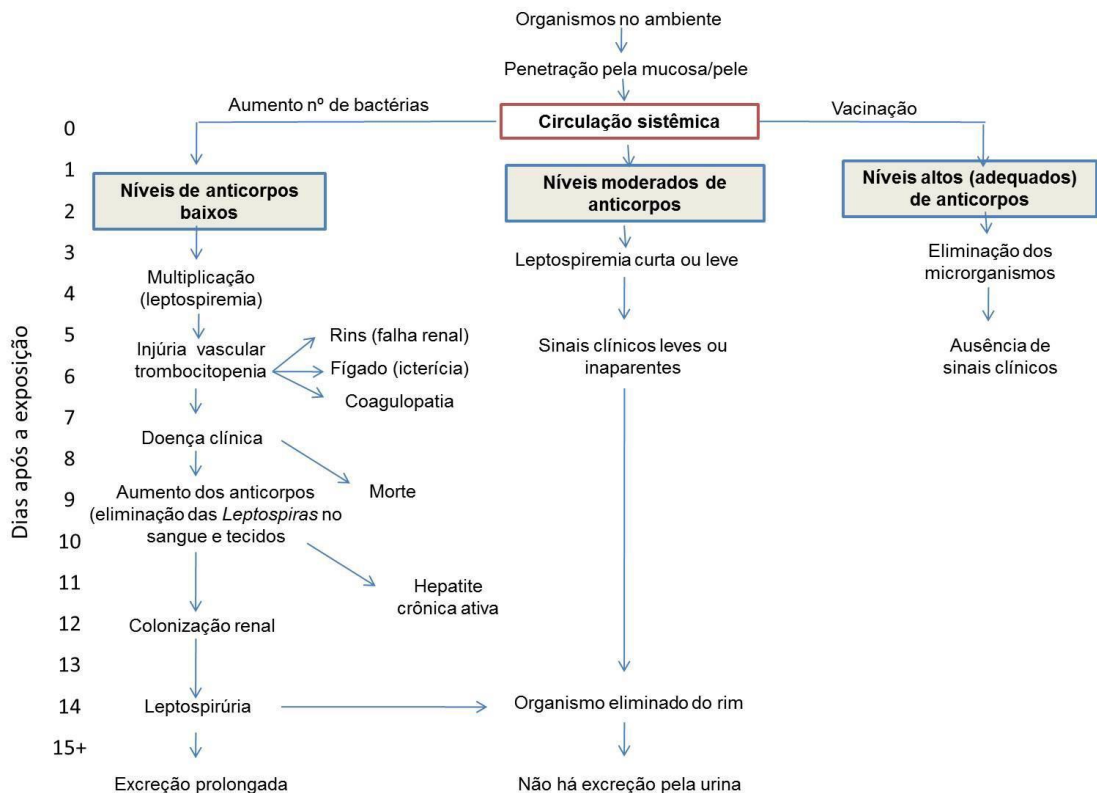


Figura 3 - Cronologia da infecção por *Leptospira* sp. de acordo com os diferentes estados imunológicos do hospedeiro. Fonte: SANTOS, 2014 (Adaptado de GREENE et al., 2006).

A infecção por leptospira pode causar uma série de sinais clínicos conforme a suscetibilidade do animal, tais como febre, icterícia, hemorragias, insuficiência renal e hepática podendo leva-lo a óbito. Entretanto, pode ocorrer uma infecção inaparente que está provavelmente relacionada com sorovares adaptados ao hospedeiro (BHARTI et al., 2003). Em animais de produção, a leptospirose ocasiona desordens reprodutivas com conseqüente queda na produtividade dos rebanhos acometidos. Ocorre nascimento de animais debilitados, abortamentos, natimortos, repetições de cio, mastite, nefrite e condenação de vísceras após inspeção veterinária (FAINE et al., 1999; SANTA ROSA et al., 1961; SANDOVAL et al., 1979). As perdas econômicas causadas pela leptospirose estão ligadas as falhas reprodutivas, queda da produção de leite e custos com medicamentos, assistência veterinária, vacinas e exames laboratoriais (FAINE et al, 1999).

Sabe-se que o abortamento em bubalinos pode ocorrer devido a infecção por *Leptospira* sp. de maneira semelhante ao que acontece em bovinos como

consequência da infecção sistêmica (FAINE et al., 1999). Ainda na fase de leptospiremia pode ocorrer a morte fetal com ou sem degeneração da placenta, seguida da eliminação fetal após algumas semanas da infecção. Os abortos ocasionados pela leptospirose geralmente ocorrem no terço final da gestação (NARDI et al, 2006). A taxa de aborto pode variar conforme a região estudada e a técnica de diagnóstico utilizada, além disso a ausência de lesões em fetos abortados não deve excluir o diagnóstico de *Leptospira* sp., pois sorovares adaptados ao hospedeiro podem não causar lesões significativas (ANTONIASSI et al., 2013). Em pesquisa realizada por ANTONIASSI et al. (2013) no estado do Rio Grande do Sul, foram pesquisadas as causas de aborto bovino em 490 casos atendidos utilizando a técnica de imunofluorescência direta. Foi possível realizar o diagnóstico definitivo em 46,32% (227/490) dos fetos abortados, sendo que 3 casos foram atribuídos a infecção por *Leptospira* sp. Com resultados mais elevados, CORTEZ et al. (2006) diagnosticaram DNA de *Leptospira* sp., usando a técnica de PCR, em 3,2% (4/124) de fetos bovinos abortados provenientes de estados brasileiros (AL, GO, MG, MS, MT, RS e SP). Já LANGONI et al. (1999) isolaram a *Leptospira* sp. dos rins de 12,5% (15/120) de fetos bovinos abortados provenientes do município de Botucatu, São Paulo. Tais estudos demonstram a importância desse agente como causador de abortos e reforçam a ideia da necessidade de melhores abordagens metodológicas no entendimento da leptospirose.

No entanto, alguns autores destacam que a etiologia dos problemas reprodutivos é de causa multifatorial, sendo que as doenças infecciosas representam aproximadamente 30% das causas de mortalidade embrionária, fetal e natimortalidade. Ressalta ainda que os agentes envolvidos podem ser virais, bacterianos e parasitários, necessitando de análise conjunta de dados zootécnicos, epidemiológicos, clínicos e técnicas laboratoriais para o correto diagnóstico (DEL FAVA et al., 2007).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da leptospirose é feito com base no histórico epidemiológico e nos sinais clínicos. Para confirmação do diagnóstico clínico e epidemiológico podem ser utilizados métodos sorológicos, de demonstração microbiológica do agente ou ainda métodos moleculares (LEVETT, 2001).

A pesquisa de leptospiros em material clínico por microscopia em campo escuro é um dos métodos microbiológicos utilizados para o diagnóstico da leptospirose, porém apresenta baixa sensibilidade e especificidade, não sendo recomendado como diagnóstico isolado. A cultura positiva de amostras biológicas (sangue, urina e tecidos) é o método de diagnóstico definitivo da infecção, contudo a sua difícil execução, podendo levar até seis meses para obtenção de um resultado, não configura um método adequado como rotina biológica (LEVETT, 2001; SCHULLER et al., 2015).

Atualmente, a soroglutinação microscópica (SAM) que detecta os anticorpos anti-leptospiros em amostras de soro e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA da *Leptospira* sp. são as ferramentas mais úteis, disponíveis e importantes no diagnóstico da infecção. Esses testes possuem vantagens e desvantagens e o desempenho de cada técnica varia conforme a presença de alguns fatores, principalmente em relação a fase da infecção (SCHULLER et al., 2015).

A soroglutinação microscópica (SAM) é o teste sorológico de referência no diagnóstico laboratorial da leptospirose, recomendado pela Organização Mundial da Saúde. É recomendado também para inquéritos soropidemiológicos, pois permite o fornecimento de informações a respeito de quais sorogrupos estão presentes em uma determinada população. É realizada com antígenos vivos de vários sorovares de *Leptospira* sp. que reagem com os anticorpos presentes no soro do homem ou de animais, sendo as reações examinadas em microscópio de campo escuro para determinação do título de aglutinação. No painel de antígenos é necessário incluir os sorovares representativos da região a ser estudada, caso o sorovar infectante não esteja incluído no painel é possível que ocorra um resultado falso-negativo (LEVETT, 2001).

A SAM é um teste específico e sensível para detecção de *Leptospira* sp., porém uma de suas desvantagens é a necessidade de estrutura laboratorial para cultura e manutenção de painéis de leptospiros vivos. Além disso, podem ocorrer reações cruzadas, pois os pacientes infectados podem produzir anticorpos que reagem com diversos sorovares simultaneamente. Esse fenômeno ocorre principalmente na fase inicial da doença (LEVETT, 2001; WHO, 2003). Devido a baixa sensibilidade para a identificação do sorovar infectante, não é possível concluir que o sorovar utilizado como

antígeno para a realização da SAM seja o causador da infecção. Dessa forma, o resultado da reação indica o provável sorogrupo no qual o sorovar infectante está incluído (SYKES, et al, 2011). Além disso, o sorogrupo com maior título pode variar ao longo do tempo, indicando que a SAM não detecta com precisão o sorogrupo em animais com infecção aguda (MILLER et al, 2011). Outras desvantagens da SAM incluem detecção de anticorpos apenas de sete a 10 dias após a infecção (tempo necessário para que o animal produza anticorpos), não indica a ocorrência de uma infecção ativa, os portadores podem apresentar títulos abaixo dos níveis detectáveis e não distingue títulos vacinais (WHO, 2003).

O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizado no diagnóstico da leptospirose por meio da detecção e amplificação do DNA de *Leptospira* sp. de diversos tecidos ou fluidos corpóreos, tais como sangue e urina, além de ser usada em amostras de solo, água, entre outros. O PCR pode ser utilizado para diagnóstico precoce da doença, quando títulos de anticorpos ainda não estão detectáveis (WHO, 2003).

A escolha do tipo de amostra a ser utilizada vai depender da fase da infecção, já que as leptospirosas podem ser encontradas no sangue nos primeiros dez dias da infecção, na fase de leptospiremia, e após esse período podem ser encontradas na urina dos animais infectados na fase de leptospirúria. Entretanto, podem ocorrer variações dependendo da resposta imune do hospedeiro e do tipo de leptospira infectante. Após a morte do animal, é possível utilizar a técnica de PCR em amostras de tecidos, sendo que durante a fase crônica da infecção o rim é o tecido de eleição para a colonização por leptospirosas, enquanto que na fase de leptospiremia o fígado é órgão mais comumente afetado (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; SCHULLER et al., 2015). Em estudo realizado por LEVETT (2001) é possível identificar a provável fase de infecção de acordo com os resultados dos testes utilizados. Na fase aguda de leptospiremia quando o agente se encontra no sangue e tecidos como o fígado, é possível utilizar técnicas de diagnóstico para detecção direta do agente como a cultura ou PCR. A partir da segunda semana inicia-se a fase crônica ou convalescente e os métodos de detecção direta podem encontrar o agente em amostras de urina ou rim. A produção de anticorpos inicia-se ainda na primeira semana, podendo ser detectada na SAM no final

da fase aguda, e atingem o nível máximo de produção na segunda e terceira semana permanecendo detectáveis por meses ou anos e podem declinar a taxas variáveis de acordo com a imunidade de cada animal. Amostras de soro testadas nos momentos 1 e 2 auxiliam na detecção de fase aguda e crônica da doença, enquanto no momento 3 auxiliam no diagnóstico de uma resposta imune atrasada. Já as amostras de soro testadas nos momentos 4 e 5 fornecem informações epidemiológicas como o provável sorovar infectante (Figura 4).

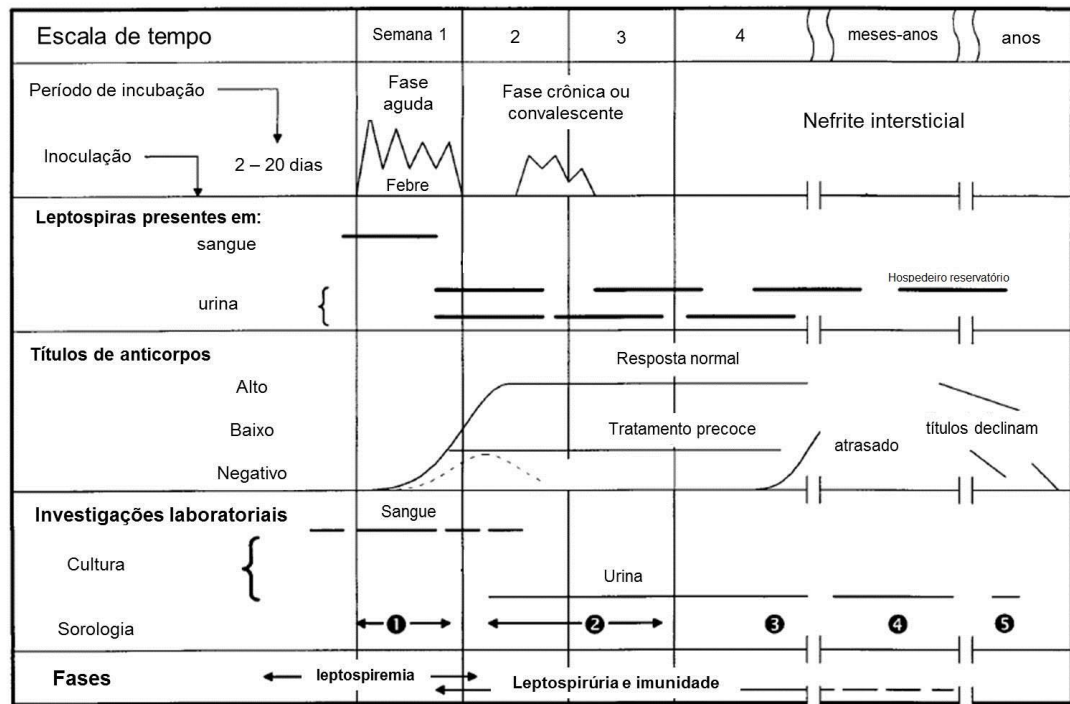


Figura 4 - Representação esquemática das fases aguda e crônica da leptospirose. Fonte: Adaptado de LEVETT (2001).

Um resultado positivo utilizando amostra de sangue, juntamente com a presença dos sinais clínicos é um forte indício de leptospirose aguda. Já o resultado positivo em urina indica o acometimento renal, que pode ocorrer tanto na fase aguda quanto na fase crônica onde o animal se torna portador renal de leptospiras. Resultados negativos não excluem a infecção, pois a fase de leptospiemia ocorre apenas nos estágios iniciais e a excreção urinária ocorre de forma intermitente (SCHULLER et al., 2015).

A PCR em tempo real (qPCR) representa um avanço na tecnologia da PCR. Esse método associa a metodologia de PCR a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. A metodologia permite a

amplificação, detecção e quantificação de DNA em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações. A qPCR confere maior precisão e reprodutibilidade quando comparado com a PCR convencional (PEREIRA; MACIEL, 2004).

A grande desvantagem das técnicas convencionais de PCR é a incapacidade de identificar o sorovar infectante (LEVETT, 2001). Tanto com propósitos clínicos quanto para estudos epidemiológicos e de saúde pública da leptospirose, a classificação de isolados de leptospira por meio de métodos moleculares permite maior precisão na determinação dos sorovares infectantes. Para tanto, alguns métodos têm sido descritos e avaliados para identificação genotípica dos sorovares, tais como análise da variação do número de repetições em tandem (VNTR) (MAJED et al., 2005).

Uma variação da PCR, conhecida como nested PCR (nPCR), utiliza dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subsequentes, cujo produto de amplificação da primeira reação é utilizado como molde para a segunda. Esse teste tem alta sensibilidade e especificidade (LIMA et al., 2009).

O sequenciamento do gene 16S rRNA, também designado 16S rDNA, é comumente utilizado para fins taxonômicos de bactérias, sendo considerado uma abordagem padrão para a diferenciação de espécies. Esse método pode ser utilizado para diferenciação de espécies dentro do gênero *Leptospira* sp., além de ser usado também para comparação entre os diferentes isolados de leptospira (MOREY et. al., 2006).

2.7 CONTROLE E PROFILAXIA

A leptospirose é uma doença de caráter populacional e ambiental. Seu controle está relacionado a medidas de prevenção aplicadas aos animais e ao ambiente onde vivem. Com relação ao controle, a vacinação é uma ferramenta de prevenção que proporciona imunidade humoral aos animais. Essa imunidade os protege contra a manifestação de sinais clínicos da leptospirose (ARDUINO et al, 2009). Entretanto, a vacinação possui algumas limitações uma vez que o *pool* vacinal é constituído por apenas alguns sorovares prevalentes na espécie em questão, não conferindo proteção contra outros sorovares. Dessa forma, como a proteção é sorovar específica, a vacina

deve ser feita com o menor número possível de sorovariedades e com ênfase para àquelas presentes na região e no rebanho (ARAÚJO et al, 2005). No Brasil, as vacinas comerciais são parcialmente efetivas, pois não atendem a esse pré-requisito, sendo muitas vezes incluídos sorovares com baixa importância epidemiológica para a região, podendo levar a falhas vacinais, além de custos desnecessários e interferência no diagnóstico sorológico que pode detectar anticorpos vacinais (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; RODRIGUES et al., 2011). Sendo assim, a identificação e caracterização de leptospiros são fundamentais para a produção de vacinas mais eficazes contendo as sorovariedades que estejam realmente infectando determinado rebanho, induzindo a imunidade mais eficiente e duradoura (CHIARELI et al., 2012).

Outras medidas relacionadas ao manejo ambiental são de fundamental importância para o controle da doença, tais como saneamento básico adequado, controle da população de roedores, isolamento de animais doentes, quarentena de animais novos introduzidos no plantel, fornecimento de água e alimentos limpos e de qualidade, higiene de equipamentos e manutenção dos animais longe de áreas alagadas (LEVETT, 2001).

2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bubalinocultura é uma atividade econômica rentável e amplamente difundida na região norte do Brasil, principalmente na Ilha do Marajó. Nessa região, os búfalos se tornaram uma alternativa viável para pequenos produtores e produção familiar, que os utilizam principalmente para produção de leite e carne.

Devido a grande importância da bubalinocultura para os produtores rurais da Ilha do Marajó, é de grande relevância a investigação de doenças infectocontagiosas que possam causar prejuízos reprodutivos e conseqüentemente perdas econômicas.

A leptospirose, além de causar danos reprodutivos em animais de produção, é uma zoonose que pode causar impactos na saúde pública. Dessa forma, é importante definir o papel dos búfalos no ciclo epidemiológico da leptospirose, uma vez que esses animais podem atuar como reservatórios e servirem como fontes de infecção para o homem e outros animais.

REFERÊNCIAS

ABCB – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: <www.bufalo.com.br/racas.html> Acesso em: 19 mar. 2015.

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

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In: **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, v. 1, p. 175-186, 2003.

ALMEIDA, L. P.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S.; GERMANO, P. M. L. Levantamento soro epidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 76-81, 1994.

ANTONIASSI, N. A. B.; JUFFO, G. D.; SANTOS, A. S.; PESCADOR, C. A., CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Causas de aborto bovino diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 155-160, 2013.

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

ARDUINO, G. G. C.; GIRIO, R. J. S.; MAGAJEVSKI, F. S.; PEREIRA, G. T. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n. 7, p. 575-582, 2009.

BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, I. J.; LIMA, F. S.; NETO, J. O. A. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinay Research and Animal Science**, v.41, p.131-136, 2004.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Disease**, v. 3, p. 757-771, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde. Normas e manuais técnicos. 816 p. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Rede Interagencial de Informações para a Saúde (RIPSA). **Incidência de Leptospirose**. In: IDB-2010 Brasil - Indicadores e Dados Básicos para a Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

CORREA, F. N. **Estudo epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2011, 115 p.

CORRÊA, S. H. R. Leptospirose. In: CATAO, J. L.; CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. cap. 44, p. 737

CORTEZ A., CASTRO A. M. G., HEINEMANN M. B., SOARES R. C., LEITE R. C., SCARCELLI E., GENOVEZ M. E., ALFIERI A. A., RICHTZENHAIN L. J. Detecção de ácidos nucleicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1226-1228, 2006.

CHIARELI, D. COSATE, M. R. V., MOREIRA, R. C. L.; LOBATO, F. C. F., SILVA, J. A.; TEIXEIRA, J. F. B.; MARCELINO, A. P. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 633-639, 2012.

CHIEBAO, D. P. **Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Leptospira* spp. em bovinos do Estado do Pará: estudo de possíveis variáveis para ocorrência de infecção**. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecniada Universidade de São Paulo, 2010.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M.; GENOVEZ, M.E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do Instituto Biológico. **Biológico**. v.69, n.2, p. 73-79, 2007.

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

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

GIRALDO, J. L. M.; HOYOS, J. A. C.; GARCIA, I. W.; ABELEDO, M. A. Prevalencia de anticuerpos a *Brucella abortus*, *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* in hatos bovinos y bubalinos em el Departamento de Caquetá, Colombia. **Revista Salud Animal**, v. 36, n. 2, p. 80-89, 2014.

HEATH, S. E.; JOHNSON, R. Leptospirosis. **Journal American Veterinary Medical Association.**, v. 205, n. 11, p. 1518-1523, 1994.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2011. Rio de Janeiro. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf Acesso em 19/01/2015.

JOUGLARD, S. D. D. **Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de *Leptospira* spp. por sequenciamento do 16s rDNA e análise de VNTR.** Tese de Doutorado em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005, 81p.

KO A. I.; REIS M. G.; DOURADO C. M. R.; JOHNSON W. D; RILEY L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, v. 354, p. 820-825, 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 736-747, 2009.

LANGONI H., SOUZA L. C., SILVA A. V., LUVIZOTTO M. C., PAES A. C., LUCHEIS S.B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, p. 271-275, 1999.

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

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

LIMA, J. F. C.; MONTENEGRO, L. M. L.; MONTENEGRO, R. A.; CABRAL, M. M. L.; LIMA, A. S.; ABATH, F. G. C. SCHINDLER, H. C. Desempenho da técnica nestedPCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 7, p. 690-697, 2009.

MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F.; GÍRIO, R. J. S.; DEL FAVA, C. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 3-4, p. 111-114, 1998.

MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Identification of variable-number-tandem-repeat loci in *Leptospira*

interrogans senso stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 539-545, 2005.

MAJOR, A.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T. Increasing Incidence of Canine Leptospirosis in Switzerland. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p.7242-7260, 2014.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; GIRON, I. S. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 09, p. 2219-2224, 1992.

MILLER, M. D.; ANNIS, K. M.; LAPPIN, M. R.; LUNN, K. F. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 426-432, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica/dados, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em 29/12/2015.

MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; BRAGG, S. L.; STEIGERWALT, A. G.; MAYER, L. W.; LEVETT, P. N. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3510-3516, 2006.

NARDI JUNIOR, G.; RIBEIRO, M. G.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; JORGE, A. M.; GERONUTTI, L.; MORAIS, Z. M. Perfil de aglutininas anti-*Leptospira* em bezerras búfalas vacinadas com bacterina pentavalente comercial contra leptospirose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 299-304, 2006.

NARDI JUNIOR, G.; GENOVEZ, M.E.; RIBEIRO, M.G.; CASTRO, V.; JORGE, A. M. Interference of vacinal antibodies on serological diagnostic of leptospirosis in vaccinated buffalo using two types of commercial vaccines. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 38, p. 363-368, 2007.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **International Journal of Infection Diseases**, v. 12, p. 351-357, 2008.

PEREIRA, F.; MACIEL, L. **PCR quantitativo em tempo real**. Biologia Molecular. Publicações Weinmann. 2004. Disponível em: <<http://www.publicacoesweinmann.com.br/2009/04/pcr-quantitativo-em-tempo-real.html>> Acesso em: 21 de Abril de 2014

RODRIGUES, R. O.; HERRMANN, G. P.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; LOPES, L. B.; MOREIRA, E. C. Comparação entre a imunidade induzida em bovinos vacinados com bacterinas polivalentes comerciais e uma monovalente experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.10-16, 2011.

SANDOVAL, L. A.; ARRUDA, N. M.; TERUYA, J. M.; GIORGI, W.; AMARAL, L. B. S.; MAZANTI, M. T. Pesquisas em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 45, n. 11-12, p. 209-212, 1979.

SANTA ROSA, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; TROISE, C. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de bovinos em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 28, p. 1113-1118, 1961.

SANTOS, T. N.; CARVALHO, F. S.; BEZERRA, R. A.; WENCESLAU, A. A.; ALBUQUERQUE, G. R.; DIAS, R. C. Diagnóstico molecular de leptospirose em suínos abatidos clandestinamente no município de Itabuna, BA. **Revista Brasileira de Medicina Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 195-199, 2011.

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. E. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p.159-179, 2015.

SYKES, J. E.; HARTMANN, K.; LUNN, K. F.; MOORE, G. E.; STODDARD, R. A.; GOLDSTEIN, R. E. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011.

SILVA, M.S.T.; LOURENÇO JR, J.B.; MIRANDA, H.A. *et al.* **Programa de incentivo à criação de búfalos por pequenos produtores, PRONAF-Pará, 2003.** Belém: CPATU, 2003. 20 p.

SILVA, J. B.; LOPES, C. T. A.; PINHEIRO, C. P.; LIMA, D. H. S.; SILVA, R. S. L.; FONSECA, A. H.; ARAÚJO, F. R.; BARBOSA-NETO, J. D. Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 847-850, 2013.

VANASCO, N. B.; SEQUEIRA, M. D.; SEQUEIRA, G.; TARABLA, H. D. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 60, p. 227-235, 2003.

VASCONCELLOS, S.A.; BARBARINI JR, O.; UMEHARA, O.; MORAES, Z.M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A. C.M.; FERREIRA NETO, J.S. Leptospirose Bovina. Níveis de ocorrência e sorotipo predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, p. 7-15, 1997.

VINETZ, J.M.; Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, p. 527-538, 2001.

WASINSKI, B.; DUTKIEWICZ, J. Leptospirosis – current risk factors connected with human activity and the environment. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM**, v. 20, n. 2, p. 239-244, 2013.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. Malta, 2003.

WHO – World Health Organization. **Leptospirosis: an emerging public health problem**. Weekly epidemiological record, v. 86, n. 6, p. 45-52, 2011.

3. OCORRÊNCIA DE *Leptospira* SP. EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) NA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL.

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Leptospira* que pode comprometer a sanidade de rebanhos bubalinos, gerar problemas reprodutivos e conseqüentemente prejuízos econômicos. O objetivo do estudo foi determinar a ocorrência de *Leptospira* sp. em 212 amostras de soro e 145 amostras de sangue total de búfalos provenientes de 21 propriedades localizadas em 4 municípios da região leste da Ilha do Marajó, Pará. Para análise das amostras de soro foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), utilizando 17 sorovares de *Leptospira* sp., considerando-se reagentes as amostras cujo título fosse igual ou superior a 1:100. A técnica de PCR foi usada para analisar as amostras de sangue total. A ocorrência de amostras de soro reagentes foi de 20,75% (44/212), onde 76,19% (16/21) das propriedades apresentaram ao menos um animal reagente. Dentre os sorovares testados, os mais prevalentes foram Pomona (40%) e Hardjo CTG (26%), com o maior título de 800. Todas as amostras de sangue total foram negativas para a técnica de PCR. Não houve diferença significativa na soropositividade entre machos e fêmeas e o número de animais soropositivos com idade superior a 1,5 anos foi superior aos demais ($P < 0,05$). Este estudo evidenciou a ocorrência de anticorpos para diversos sorovares de *Leptospira* sp. e a alta disseminação desse agente entre as propriedades analisadas. Tais achados evidenciam a importância de um controle sanitário efetivo para evitar perdas econômicas e agravos a saúde pública.

Palavras-chave: leptospirose, saúde pública, soroaglutinação microscópica, PCR.

OCURRENCE OF *Leptospira* sp. IN BUFFALOES (*Bubalus bubalis*) FROM MARAJÓ ISLAND, PARÁ, BRAZIL.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis of worldwide distribution caused by bacteria the genus *Leptospira* that may compromise the health of buffalo herds, developing reproductive problems and consequently economic losses. The aim of the study was to determine the occurrence of *Leptospira* sp. in 212 serum samples and 145 whole blood samples of buffalo from 21 properties in four municipalities in eastern region Marajó Island, Pará. For analysis of serum samples was used microscopic agglutination technique (MAT) with 17 *Leptospira* sp. serovars, considering reagents samples whose title was equal or higher than 1:100. The PCR technique was used to analyze whole blood samples. The occurrence of reagents serum samples was 20.75% (44/212), where 76.19% (16/21) of the properties presented at least one reagent animal. Among the tested serovars, the most prevalent serovars were Pomona (40%) and Hardjo CTG (26%) with the highest titer of 800. All whole blood samples were negative for PCR. There was no significant difference in seropositivity between males and females and the number of positive animals over the age of 1.5 years was superior to the others ($P < 0.05$). This study demonstrated occurrence of antibodies to many different *Leptospira* sp. serovars and the high dissemination of this agent among these properties studied. These findings highlight the importance of an effective sanitary control to prevent economic losses and aggravations to public health.

Keywords: leptospirosis, public health, microscopic agglutination test, PCR.

3.1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Leptospira* (WHO, 2003). Existem 13 espécies patogênicas, classificadas de acordo com o seu genoma: *Leptospira alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilli* e *L. wolffi*, com mais de 260 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Os reservatórios da leptospira são os animais domésticos, silvestres e sinantrópicos que podem atuar como hospedeiros acidentais ou de manutenção. Hospedeiros de manutenção podem desenvolver infecção crônica, permanecendo assintomáticos e eliminando leptospiras na urina por longos períodos de tempo. A doença é transmitida ao homem e aos animais suscetíveis através do contato direto ou indireto com a urina dos animais reservatórios (LEVETT, 2001).

A técnica de diagnóstico recomendada pela Organização Mundial da Saúde é a soroprecipitação microscópica (SAM). Considerada padrão ouro, essa técnica detecta anticorpos contra diversos sorovares de *Leptospira* sp. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada no diagnóstico da leptospirose por meio da detecção e amplificação do DNA de *Leptospira* sp. de diversos tecidos ou fluidos corpóreos, tais como sangue, urina, rim e fígado, podendo auxiliar no diagnóstico precoce da doença, quando os títulos de anticorpos ainda não são detectáveis e também para a detecção de um animal portador dentro do rebanho (HAMOND et al, 2012; WHO, 2003).

A bubalinocultura é uma atividade pecuária rentável e está em plena expansão no Brasil. De acordo com dados da Pesquisa da Produção Pecuária Municipal (IBGE, 2011) o estado do Pará possui aproximadamente 485.033 cabeças de bubalinos, sendo que 64% (311.664) desse efetivo se encontra na Ilha do Marajó que possui o maior rebanho brasileiro dessa espécie. Os búfalos são suscetíveis a diversas enfermidades infecciosas que podem comprometer a sanidade do rebanho e causar graves prejuízos econômicos, dessa forma os estudos sobre doenças que acometem esses animais são essenciais para determinar medidas sanitárias específicas (BERNARDES, 2007). Além disso, os búfalos podem ter participação no ciclo epidemiológico da leptospirose,

eliminando as leptospiros no ambiente pela urina atuando como fonte de infecção para as pessoas que manejam os animais e também para outros animais criados na mesma propriedade (LANGONI et al., 1999).

No Brasil, estudos determinando a prevalência dos diferentes sorovares de *Leptospira* sp. em búfalos tem sido realizados. LANGONI et al. (1999) e FUJII et al., (2001) em estudo sorológico com animais provenientes do Vale do Ribeira no estado de São Paulo, encontraram 37,7% (152/403) e 50,9% (113/222) de animais positivos, com prevalência dos sorovares Wolffi e Australis, respectivamente. No estado de São Paulo, FAVERO et al. (2002), encontraram 43,7% de positividade dentre 879 amostras de soro de búfalos, sendo o sorovar Hardjo o mais prevalente. VIANA et al. (2009) em pesquisa com búfalos de três regiões do Baixo Amazonas, Ilha do Marajó e município do Xinguara no Pará e SILVA et al. (2009) estudando a soroprevalência em municípios da região nordeste do estado do Pará, obtiveram em média 80% (164/205) e 67,72% (86/127) de positividade, com os sorovares Autumnalis e Hardjo apresentando as maiores prevalências, respectivamente.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de *Leptospira* sp. em búfalos provenientes dos municípios de Soure, Salvaterra, Cachoeira do Arari e Muaná na Ilha do Marajó – PA, utilizando as técnicas de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro e a reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) em amostras de sangue total.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área do Estudo

A ilha do Marajó pertence ao estado do Pará, sendo considerado o maior arquipélago flúvio-marítimo do mundo, banhado pelo Oceano Atlântico e pelos rios Amazonas e Pará, e localizada a 80 km da capital Belém. As amostras foram colhidas nos municípios de Salvaterra (22.370 habitantes), Soure (24.286 habitantes), Cachoeira do Arari (22.449 habitantes) e Muaná (37.977 habitantes) (Figura 1). O clima predominante é equatorial, quente e úmido (média de 27° C) com chuvas abundantes no período de janeiro a março (IBGE, 2011). A população de búfalos nessas cidades é de aproximadamente 16.115, 60.226, 37.256 e 29.727, respectivamente, segundo a Produção Pecuária Municipal (IBGE 2011), representando 46% (143.324/311.664) da população total de búfalos da Ilha.

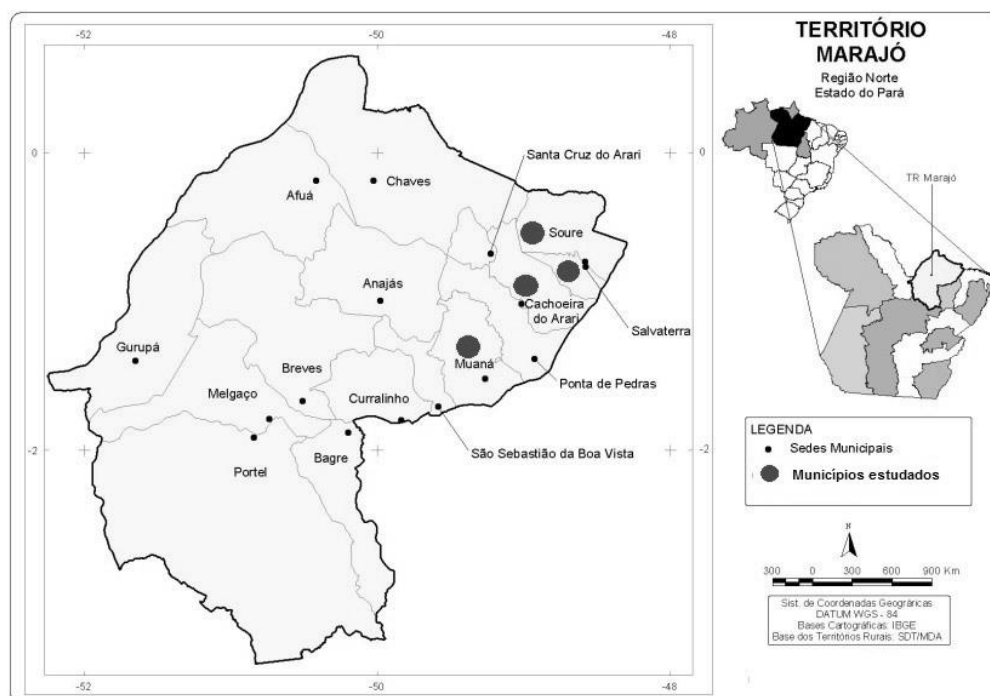


Figura 5 - Localização da Ilha da Marajó – PA e municípios estudados.

3.2.2 Animais experimentais

Os búfalos estudados pertencem a espécie *Bubalus bubalis*. As raças predominantes na Ilha do Marajó são Múrrah, Jaffarabadi e Mediterrâneo, além de seus mestiços. Foram amostrados 212 animais provenientes de 21 propriedades, sendo 83% (176/212) fêmeas e 17% (36/212) machos, com idades variando entre 2 meses a 13 anos de idade distribuídos em 2 faixas etárias da seguinte forma: 118 animais de 2 meses a 1 ano e 6 meses e 94 animais acima de 1 ano e 6 meses conforme realizado por SUWANCHAROEN et al. (2013).

3.2.3 Colheita de amostras

Foram colhidas 212 amostras de soro e 140 amostras de sangue total. Todas as amostras de sangue total possuem amostras de soro correspondentes.

Para essa etapa os animais foram contidos fisicamente utilizando troncos de contenção e as amostras foram colhidas por punção da veia jugular externa, utilizando-se um sistema para colheita a vácuo, constituído de agulhas 25 x 8 mm (21 g) para múltipla colheita, acoplados a tubos com e sem anticoagulante com capacidade de aspiração para 10 mL de sangue. Para obtenção de soro as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos. Os soros foram aspirados e aliqüotados em microtubos com capacidade para 1,5 mL, assim como as amostras de sangue total e congelados a - 20°C para posterior processamento.

3.2.4 Soroaglutinação Microscópica

A presença de anticorpos contra *Leptospira* sp. no soro dos animais foi realizado por meio do teste de soroaglutinação microscópica (SAM) no Núcleo de Pesquisas em Zoonoses da UNESP Campus Botucatu. Foram considerados reagentes títulos ≥ 100 e a ocorrência de reação cruzada ou co-infecção (WHO, 2003), utilizando-se 17 antígenos de *Leptospira* sp. (Quadro 1)

QUADRO 1 - ANTÍGENOS DE *Leptospira* sp. UTILIZADOS NA TÉCNICA DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM).

Sorogrupo	Sorovar
Australis	Bratislava
Canicola	Canicola
Djasiman	Djasiman
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
	Icterohaemorrhagiae
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo
	Wolffi
	Hardjo Prajtno
	Hardjo Minis
	Hardjo CTG
	Hardjo Bovis
	Guaricura
Ballum	Castellonis
Shermani	Tarassovi
Grippotyphosa	Grippotyphosa

Para a prova de triagem, as amostras de soro foram diluídas a 1:50, utilizando-se 100µL de soro e 4.9 mL de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) pH 7,6. Em microplacas, devidamente identificadas e marcadas, distribuiu-se 25 µL do soro diluído e adicionou-se 25 µL dos sorovares, passando a diluição final em cada poço para 1:100. O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra de controle negativo. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C durante 2h. A leitura foi realizada diretamente na microplaca em microscópio de campo escuro, considerando reagentes as amostras que apresentaram no mínimo 50% de aglutinação.

A prova de titulação foi realizada com as amostras positivas na prova de triagem e apenas com os sorovares reagentes. A partir da diluição 1:100, as amostras foram diluídas em razão 1:2 até a diluição de 1:3200. Após a incubação por 2 horas, a leitura é realizada conforme descrito na prova de triagem, considerando como título a maior diluição do soro capaz de aglutinar 50% ou mais das leptospiras em comparação com o controle negativo.

3.2.5 Reação em cadeia da polimerase

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizadas as amostras de sangue total. A extração de DNA foi realizada utilizando o PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA) conforme recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas em fluorômetro Qubit (Invitrogen, USA) e a integridade do DNA foi verificada utilizando gel de agarose a 0,8% corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA). Para o controle positivo da extração foi utilizado uma cepa de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, mantida em meio EMJH, previamente centrifugada (3000 rpm por 10 minutos) e ressuspensa 2 vezes em PBS pH 7,6 estéril. Água Miliq foi utilizada como controle negativo.

Para amplificação do DNA de *Leptospira* sp., foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos descritos por Mérien et al. (1992), os quais amplificam 331 pb conforme segue: LEP 1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3') e LEP 2 (5' TTCCCCCATTGAGCAAGATT 3').

A amplificação do DNA foi realizada de acordo com protocolo adaptado descrito por Mérien et al. (1992). As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL nos volumes totais de 25 µL, sendo solução tampão de PCR 1x (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0), MgCl₂ 1,5mM, dNTP 0,2 mM, *Taq Platinum* DNA polimerase 1U/µL (Invitrogen, USA) e cada iniciador 0,6 µM. As amostras de DNA extraídas foram adicionadas ao mix na concentração aproximada de 100 ng/µL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador vapo.protect (Eppendorf), com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 63°C por 1 min e meio e extensão a 72°C por 2 min, incluindo-se 10 min adicionais a 72°C, para completar a extensão dos segmentos amplificados.

Os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos a técnica de eletroforese. Preparou-se gel de agarose a 1% SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA). Foram utilizados 10 µL do produto de PCR e como marcador de peso molecular foi utilizado o 100 pb ladder (Invitrogen, USA). O gel foi submetido a corrida eletroforética em cuba contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09 m de ácido bórico e 0,001 M de EDTA) e a uma voltagem de 60 V por aproximadamente 1 h. O gel foi visualizado no Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia, Brasil).

3.2.6 Análise Estatística

Foi estimada a frequência de animais positivos para a infecção de acordo com as variáveis qualitativas avaliadas. As associações entre as variáveis epidemiológicas e os resultados da sorologia foram analisadas pelos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, considerando-se nível de significância (α) de 5%. Todos os testes foram realizados com o programa Statistix 9.0.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 212 amostras de soro analisadas, 44 foram reagentes para pelo menos um dos 17 sorovares testados. Foram considerados como reagentes os títulos ≥ 100 , além da ocorrência de reação cruzada e/ou co-infecção, ou seja, quando o animal se apresentou infectado com mais de um sorovar. ADLER; MOCTEZUMA (2010) afirmaram que o critério para se considerar um resultado indicativo da ocorrência de infecção ativa por *Leptospira* sp. é aceito com títulos ≥ 400 no teste de SAM na presença de sinais clínicos, entretanto títulos menores podem indicar apenas o contato prévio do animal com o agente infectante ou ainda animais em fase inicial da infecção.

Nas amostras avaliadas a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* sp. foi em média de 20,75% (44/212) e, dentre as propriedades analisadas, 76,2% (16/21) apresentaram pelo menos um animal reagente para um ou mais sorovares. A diferença de animais reagentes na SAM entre Soure e os demais municípios foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) conforme observado na Tabela 1.

TABELA 1 - OCORRÊNCIA DE *Leptospira* sp., POR MUNICÍPIOS E PROPRIEDADES, EM AMOSTRAS DE SORO UTILIZANDO A TÉCNICA DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM) E SANGUE PELA TÉCNICA DE PCR EM BÚFALOS PROVENIENTES DA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ.

Propriedade	Município	PCR		SAM	
		Nº Animais	Positivos	Nº Animais	Reagentes
1	Salvaterra	-	-	15	4
2		-	-	8	1
3		11	0	11	3
4		13	0	13	5
5		5	0	5	0
Total		29	0	52	13 (25%)
6	Soure	-	-	9	0
7		-	-	8	0
8		-	-	9	1
9		-	-	12	2
10		8	0	8	2
11		8	0	10	1
12	8	0	10	1	
Total	24	0	66	7 (10,66%)	
13	Cachoeira do Arari	10	0	10	3
14		10	0	10	2
15		9	0	10	0
16		15	0	16	2
17		8	0	10	2
18		10	0	13	8
Total	62	0	69	17 (24,63%)	
19	Muaná	4	0	4	0
20		7	0	7	4
21		14	0	14	3
Total	25		25	7 (28%)	
TOTAL GERAL		140	0	212	44 (20,75%)

A ocorrência da infecção por *Leptospira* sp. em rebanhos bubalinos pode ser muito diferente de acordo com a região estudada e do manejo sanitário praticado em cada propriedade, além das condições em que cada estudo foi realizado como o ponto de corte e número de sorovares utilizados na SAM. Pesquisas recentes foram realizadas em diversos países para determinar a ocorrência de *Leptospira* sp. em búfalos utilizando o teste de SAM. A frequência de amostras reagentes nesse estudo

(20,75%), foi menor que a encontrada por GIRALDO et al. (2014) com búfalos provenientes de Caquetá na Colômbia, onde encontraram prevalência de 37,3% de amostras reagentes. Entretanto, é importante salientar que utilizaram como ponto de corte a titulação 80, diferentemente do presente estudo onde foram considerados reagentes apenas os títulos maiores ou iguais a 100. KONRAD et al. (2013), KENAR; OZDEMIR (2013) e SUWANCHAROEN et al. (2013) também encontraram prevalência maior de *Leptospira* sp., os resultados obtidos foram de 22,2%, 32,26% e 30,5% em búfalos da Argentina, Turquia e Tailândia, respectivamente. Em estudo realizado com búfalos provenientes de Trinidad e Tobago, ADESIYUN et al. (2009) obtiveram prevalência de 14,6%, sendo esse resultado inferior aos obtidos em nosso estudo.

No Brasil, pesquisadores estudaram a prevalência de *Leptospira* sp. e seus sorovares em rebanhos bubalinos provenientes de vários estados. Em estudo realizado no estado de São Paulo, SANDOVAL et al. (1979) e GIORGI et al. (1981) encontraram 6,9 e 6,7% de amostras de soro reagentes, respectivamente, sendo essa prevalência inferior a encontrada no presente estudo. Resultados superiores foram encontrados por CARVALHO et al. (2015) e BRASIL (2015) com 70,58% e 27,9% de animais positivos, provenientes do Maranhão e Paraíba, respectivamente, e também por FAVERO et al. (2002) e LANGONI et al. (1999), ambos do estado de São Paulo, com 43,7 e 37,7% de ocorrência, respectivamente.

No estado do Pará, estudos foram conduzidos em búfalos com o objetivo de verificar a ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* sp. utilizando a técnica de SAM. DIAS et al. (2014) estudou 120 rebanhos bubalinos provenientes de diversos municípios desse estado em um total de 4444 amostras e encontraram 85,4% de animais positivos. OLIVEIRA et al. (2013) pesquisou 256 amostras de animais provenientes de três regiões do Baixo Amazonas, Ilha do Marajó e do município de Xinguara e encontraram 34,37% de animais reagentes. VIANA et al. (2009) em pesquisa com búfalos provenientes dos municípios de Soure e Cachoeira do Arari na Ilha do Marajó e Nova Timboteua e Ipixuna do Pará, ambos localizados na região nordeste do Pará, encontraram 80% de ocorrência em 212 amostras de soro. SILVA et al. (2009) utilizaram 127 amostras de animais provenientes de municípios localizados na região nordeste do estado e encontraram ocorrência de 67,72% de soropositivos.

VIANA et al. (2009) explicam que as altas ocorrências podem ser atribuídas ao manejo dos animais em áreas alagadas e principalmente ao ineficiente manejo sanitário dos rebanhos bubalinos na região amazônica, tais como falta de diagnóstico rotineiro e o controle deficiente, além da ausência de vacinação e a manutenção de animais positivos nas propriedades.

A diferença na ocorrência (20,75%) de animais reagentes do presente estudo quando comparada aos demais trabalhos realizados no Brasil e em outros países, pode ser em decorrência de alguns fatores, tais como a presença de reservatórios nas propriedades, clima, sistema de produção intensivo, extensivo ou semi-extensivo e manejo alimentar (ANDERSON, 2007). Além disso, a bubalinocultura no ambiente amazônico incluindo a Ilha do Marajó é extremamente dinâmica, diversificada e os animais são submetidos a diferentes tipos de manejo que variam conforme a situação econômica e social de cada produtor. Essas diferenças podem refletir na ocorrência da leptospirose, até mesmo em rebanhos de propriedades vizinhas ou da mesma região, como demonstrado no presente estudo onde o município de Soure teve uma baixa ocorrência quando comparado aos demais municípios (Tabela 1). Todos esses achados demonstram a importância da leptospirose para a região, incluindo a Ilha do Marajó, e a necessidade de medidas sanitárias específicas para evitar perdas econômicas nos rebanhos bubalinos e danos a saúde pública.

A ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* sp. nas propriedades amostradas pode ser considerada muito alta (76,2%). A propriedade pode ser considerada positiva quando ao menos um indivíduo é soropositivo, indicando que o rebanho obteve contato com a bactéria. ADESIYUN et al. (2009) encontraram prevalência de 60% entre as propriedades estudadas em Trinidad e Tobago. Em estudo realizado com bovinos em um município localizado na Amazônia Paraense, HOMEM et al. (2001) encontraram prevalência de 97% de propriedades com ao menos um animal soropositivo. Tais resultados indicam que, embora existam animais não reagentes nas propriedades consideradas positivas, os mesmos estão expostos ao agente que está amplamente disseminado no ambiente.

Dentre os sorovares testados, os prováveis mais prevalentes foram Pomona (40%) e Hardjo CTG (26%) e o maior título encontrado foi de 800 nesses mesmos sorovares conforme tabela 2.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DE TÍTULOS DE ANTICORPOS E SOROVARES PELO TESTE DE SORO AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA EM AMOSTRAS REAGENTES PARA *Leptospira* sp. EM BÚFALOS PROVENIENTES DA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL, 2015.

Sorovar	Título de Anticorpo (número de amostras)	Frequência (%)
Pomona	100 (9) 200 (8) 400 (2) 800 (1)	20 (40%)
Hardjo CTG	100 (4) 200 (5) 400 (2) 800 (2)	13 (26%)
Hardjo Prajтино	100 (5) 200 (2) 400 (1)	8 (16%)
Grippotyphosa	100 (1) 200 (1) 400 (2)	4 (8%)
Hardjo Bovis	400 (2)	2 (4%)
Guaricura	100 (1)	1 (2%)
Pyrogenes	100 (1)	1 (2%)
Wolffi	100 (1)	1 (2%)
Total	100 (22) 200 (16) 400 (9) 800 (3)	50 (100%)

Nota: Considerou-se que uma mesma amostra pode ser reagente para mais de um sorovar (co-aglutinação).

CARVALHO et al. (2015) e KONRAD et al. (2013) em estudo com búfalos provenientes do estado do Maranhão e da Argentina respectivamente, encontraram o sorovar Pomona com maior prevalência, semelhante aos achados do presente estudo. BRASIL et al. (2015) encontraram o sorovar Bratislava (11%) com maior prevalência, porém o sorovar Pomona também teve alta incidência aparecendo em segundo lugar (8,8%) em pesquisa realizada com búfalos provenientes da Paraíba, região nordeste do Brasil. KENAR; OZDEMIR (2013) encontraram o sorovar Hardjo Prajтино como sendo o mais prevalente (66,67%), concordando parcialmente com os achados do presente estudo, onde esse sorovar aparece como o terceiro mais encontrado. No estado de São Paulo, os sorovares Hardjo e Wolffi aparecem entre os mais prevalentes (FAVERO et al., 2002; LANGONI et al., 1999).

Nos estudos conduzidos no estado do Pará, diversos são os sorovares encontrados em maior prevalência em amostras de soro de búfalos: SILVA et al. (2009) encontraram Hardjo prajitino (15,75%) em búfalos da região nordeste do estado, já DIAS et al. (2014) demonstraram o sorovar Hardjo com maior prevalência (65,2%), enquanto VIANA et al. (2009) demonstraram o sorovar Autumnalis, seguido de Hardjo e Wolffi em animais provenientes dos municípios de Soure e Cachoeira do Arari na Ilha do Marajó e Nova Timboteua e Ipixuna do Pará. OLIVEIRA et al. (2013) encontraram o sorovar Sentot (59%) e Hardjo Bovis (20,4%) entre os mais prevalentes, em estudo no Baixo Amazonas, Ilha do Marajó e município de Xinguara no Pará.

Em outros países, os sorovares prevalentes também são diversos: Grippotyphosa e Hardjo na Colômbia (GIRALDO et al., 2014) e Copenhageni em Trinidad e Tobago (ADESIYUN et al., 2009).

As diferenças na prevalência de sorovares quando comparado a outras regiões do Brasil e outros países, assim como em outros estudos conduzidos no estado do Pará e na Ilha do Marajó, já eram esperadas. Existe grande variação nas diversas regiões do mundo em relação aos hospedeiros e aos sorovares de leptospira que carregam (LEVETT, 2001), podendo ocorrer diferenças até mesmo entre rebanhos diferentes localizados entre regiões próximas. Essas diferenças podem estar relacionadas com o grau e o tipo de exposição aos diferentes reservatórios da *Leptospira* sp., sejam eles animais domésticos, silvestres ou sinantrópicos. Além disso, fatores ambientais, ocupação, práticas agrícolas e o número e tipo de sorovares utilizados no teste de soroaglutinação microscópica também podem ter influenciado na prevalência dos diferentes sorovares (BHARTI, et al., 2003). Sendo esse último fator uma possível explicação para as diferenças ocorridas em comparação com os resultados encontrados por OLIVEIRA et al. (2013), onde o sorovar Sentot foi demonstrado em maior prevalência, já que esse sorovar não foi utilizado na bateria de antígenos do presente estudo. Diante desses resultados, sempre que a propriedade apresentar problemas reprodutivos relacionados a leptospirose, reforça-se a importância dos estudos sorológicos para conhecimento dos sorovares envolvidos e adoção de medidas de controle, como a produção de vacinas específicas para o rebanho.

Sabe-se que o abortamento em bubalinos pode ocorrer devido a infecção por *Leptospira* sp. de maneira semelhante ao que acontece em bovinos (FAINE et al., 1999), sendo os sorovares Pomona e Hardjo, descritos como causadores de aborto nessa espécie (LEVETT, 2001). Além do aborto, essas sorovariedades são também conhecidas por sua elevada patogenicidade, podendo causar icterícia, hemorragias e morte (FAINE et al., 1999; CHIEBAO, 2010). Dessa forma, ressalta-se a importância da infecção pelo sorovar Pomona encontrado em maior prevalência no presente estudo.

Os períodos de idade pré-estabelecidos indicaram diferença estatística entre búfalos soropositivos e soronegativos ($P < 0,05$) (Tabela 3). LANGONI et al. (1999), VIANA et al. (2009), KENAR; OZDEMIR (2013) e KONRAD et al. (2013) em estudo com búfalos provenientes do Vale do Ribeira, estado do Pará, Turquia e Argentina respectivamente, não encontraram diferença significativa na soropositividade dos animais com relação a idade. SUWANCHAROEN et al. (2013) em estudo com bovinos e búfalos na Tailândia demonstraram que a soropositividade para *Leptospira* sp. aumentou conforme a idade, semelhante ao presente estudo onde os animais acima de 1,5 anos tiveram maior ocorrência de anticorpos. Segundo esses mesmos autores, a explicação mais plausível para esses resultados é de que os animais mais velhos possuem mais oportunidades de exposição ao longo do tempo e conseqüentemente maior probabilidade de serem infectados e se tornarem portadores crônicos.

TABELA 3 - RESULTADO DA SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA PARA *Leptospira* sp. SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA EM ANOS DE BÚFALOS PROVENIENTES DA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, 2015.

Faixa etária	Reagentes	Não reagentes	Total	% Reagentes
< 1,5 anos	16	102	118	13,55%
>1,5 anos	28	66	94	29,8%
Total	44	168	212	

Na Tabela 4 é possível observar que o efeito sexo não influenciou significativamente na soropositividade das análises de SAM para os animais avaliados ($P > 0,05$). ADESIYUN et al. (2009) e KENAR; OZDEMIR (2013) também não

observaram influência do sexo com relação aos resultados positivos obtidos na SAM em estudo com búfalos provenientes de Trinidad e Tobago e Turquia, respectivamente.

TABELA 4 - RESULTADO DA SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM) PARA *Leptospira* sp. SEGUNDO O SEXO DE BÚFALOS PROVENIENTES DA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, 2015.

Sexo	Reagentes	Não reagentes	Total	% Reagentes
Macho	5	31	36	13,9%
Fêmea	39	137	176	22,16%
Total	44	168	212	

Todas as 140 amostras de sangue total analisadas por PCR foram negativas, ao passo que 34 amostras de soro correspondentes analisadas pela SAM foram positivas e 106 negativas.

Segundo Cheema et al. (2007) a SAM não contribui para o diagnóstico precoce da leptospirose, já que os anticorpos são detectados apenas sete a 10 dias após a infecção. Dessa forma, a PCR deve ser usada pois é um método rápido e específico de diagnóstico, podendo ser utilizada para diagnóstico precoce da doença (HAMOND et al., 2012). Em experimento com bovinos, GUMUSSOY et al. (2009) utilizaram a PCR em amostras de sangue e urina de animais sororeagentes para *Leptospira* sp., encontrando resultados positivos apenas na urina. Já FONTANA (2011) em pesquisa realizada com porcos monteiro, utilizou 151 amostras obtendo 108 reagentes na SAM e nenhum positivo utilizando a PCR em amostras de sangue total para pesquisa de *Leptospira* sp. Resultados negativos ocorreram provavelmente devido a rápida fase de leptospiremia, onde as chances de encontrar animais positivos em amostras sanguíneas é maior. ROMANI (2012) em estudo com bovinos na região do Pantanal encontrou fraca correspondência entre os resultados obtidos na PCR usando amostras de sangue em comparação com a SAM. Dentre os 133 animais sororeagentes apenas 2 foram positivos na PCR e nos 134 negativos na SAM obteve-se um positivo na PCR.

No presente estudo não houve correspondência entre os búfalos reagentes na SAM com os resultados obtidos na PCR. Tal fato pode indicar que os animais infectados não se encontram na fase de leptospiremia da infecção, pois de acordo com

LEVETT (2001), as leptospirosas possuem um curto tempo de circulação no sangue, por volta de 7 dias, de acordo com a imunidade de cada animal. Além disso, a presença de anticorpos revela o provável caráter crônico da infecção. Dessa forma, a PCR utilizando amostras de sangue é útil para o diagnóstico de *Leptospira* sp. nos primeiros dias da infecção, ou seja, na fase de leptospiremia ou fase aguda (MÉRIEN et al., 1995).

3.4 CONCLUSÃO

Anticorpos contra *Leptospira* sp. foram demonstrados em búfalos na Ilha do Marajó, não havendo concordância no diagnóstico de *Leptospira* sp. entre a PCR, utilizando amostras de sangue total e a prova de SAM. A presença desses anticorpos pode indicar a participação da espécie bubalina no ciclo epidemiológico da leptospirose, podendo atuar como reservatório do agente. Tal fato representa risco para a saúde pública, já que os búfalos podem atuar como fonte de infecção para o homem e outros animais que vivem nas propriedades. Além disso, indica a necessidade de controle sanitário efetivo, uma vez que a leptospirose ocasiona perdas econômicas no rebanho. As diferenças observadas na frequência de animais positivos nos diversos trabalhos demonstram a necessidade de realização de mais estudos na Ilha do Marajó, com foco nos fatores de risco, para melhor compreensão do ciclo epidemiológico da leptospirose na região.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M. L. Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. **Theriogenology**, v.68, p.474-486. 2007.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.
- ADESIYUN, A. A.; JACKSON, C. H.; CLARKE, N. et al. Leptospirosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Veterinarski Arhiv**, v.79, n.1, p.77-86, 2009.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Disease**, v. 3, p. 757-771, 2003.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.
- BRASIL, A. W. L.; PARENTONI, R. N.; COSTA, D. F. et al. Ocurrence of anti-*Brucella abortus* and anti-*Leptospira* spp. antibodies in buffaloes from Paraíba state, Northeastern, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 2005-2012, 2015.
- CARVALHO, O. S.; GONZAGA, L. N. R.; ALBUQUERQUE, A. S. et al. Ocurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. **African Journal of Microbiology Research**, v.9. p.598-603, 2015.
- CHEEMA, P. S.; SRIVASTAVA, S. K.; AMUTHA, R. et al. Detection of pathogenic leptospire in animals by PCR based on *lipL21* and *lipL32* genes. **India Journal of Experimental Biology**, v. 45, p. 568-573, 2007.
- CHIEBAO, D. P. **Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Leptospira* spp. em bovinos do estado do Pará: estudo de possíveis variáveis para ocorrência de infecção**. 2010. São Paulo, 109f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo.
- DIAS, H. L. T., ESPINHEIRO, R. F.; ALBUQUERQUE. et al. A serological survey to determine the commonly occurring serovars of *Leptospira* sp.in herds buffaloes in the Para State, Brazil. In: IV Conferência Nacional Sobre Defesa Agropecuária, 2014, Belém. **Anais...Belém: Defesa Agropecuária e Sustentabilidade**, 2014, p. 96-97.

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

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

FUJII, T. U.; KASAI, N.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* e contra outros agentes de abortamentos em búfalas da região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.5-9, 2001.

FONTANA, I. **Avaliação do papel do porco monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do Pantanal sul-mato-grossense**. 2011. Brasília, 61f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Programa de pós graduação em Saúde Animal, Universidade de Brasília.

GIORGI, W., TERUYA, J.M., DA SILVA, A.S., et al. Leptospirose: resultados das soroglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974/1980. **Biológico**, v. 47, p. 299-309, 1981.

GIRALDO, J. L. M.; HOYOS, J. A. C.; GARCIA, I. W. et al. Prevalencia de anticuerpos a *Brucella abortus*, *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* in hatos bovinos y bubalinos em el Departamento de Caquetá, Colombia. **Revista Salud Animal**, v. 36, n. 2, p. 80-89, 2014.

GUMUSSOY, K. S.; OZDEMIR, V.; AYDIN, F. et al. Seroprevalence of Bovine Leptospirosis in Kayseri, Turkey and Detection of Leptospire by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n.6, p.1222-1229, 2009.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. et al. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. **Veterinary Record**. v.171, n. 4, p.105-106, 2012.

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

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2011. Rio de Janeiro. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf Acesso em 19/01/2015.

KENAR, B.; OZDEMIR, V. The seroprevalence of leptospirosis in Anatolian buffaloes in Turkey. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.164, n.6, p.331-335, 2013.

KONRAD, J. L.; CAMPERO, L. M.; CASPE, G. S. et al. Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., and Apicomplexa protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina. **Tropical Animal Health Production**, v.45, p.1751-1756, 2013.

LANGONI, H.; FAVA, C. D.; CABRAL, K. G. et al. Aglutininas antileptospíricas em búfalos do Vale do Ribeira, estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p. 305-307, 1999.

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

OLIVEIRA, G. C.; SILVA, D. B.; PINHEIRO, V. L. C. et al. Pesquisa de anticorpos anti-leptospíricos em Bubalinos. In: I Simpósio Internacional de Medicina Veterinária Preventiva, 2013, Jaboticabal- SP. **Ars Veterinária**, v. 29, 2013.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; GIRON, I. S. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 09, p. 2219-2224, 1992.

ROMANI, A. R. **Investigação soropidemiológica e molecular de brucelose e leptospirose em núcleos de conservação de gado curraleiro pé duro e pantaneiro**. 2012. Goiânia, 92f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás.

SANTA ROSA, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; TROISE, C. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de bovinos em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 28, p. 1113-1118, 1961.

SANDOVAL, L. A.; ARRUDA, N. M.; TERUYA, J. M. et al. Pesquisas em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 45, n. 11-12, p. 209-212, 1979.

SUWANCHAROEN, D.; CHAISAKDANUGULL, Y.; THANAPONGTHARM, W.; YOSHIDA, S. Serological survey of leptospirosis livestock in Thailand. **Epidemiological infectious**, v.141, p.2269-2277, 2013.

SILVA, G. R.; MORAES, C. C. G.; NASCIMENTO K. C. et al. Distribuição de anticorpos para *Leptospira* sp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) da região nordeste do estado do Pará, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, p.1-5, 2009.

VIANA, R. B.; FAVA, C. D.; MOURA, A. C. B. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na Amazônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.3, p.453-457, 2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. Malta, 2003.

4. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Leptospira* sp. EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) ABATIDOS EM FRIGORÍFICO, PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE SOURE NA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL.

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Leptospira* que pode comprometer a sanidade de rebanhos bubalinos, causar problemas reprodutivos e consequentemente prejuízos econômicos. O objetivo do estudo foi determinar a ocorrência de *Leptospira* sp. em amostras de soro, sangue total, rim, fígado e urina, esses materiais foram provenientes de búfalos abatidos em um frigorífico no município de Soure, Ilha do Marajó, Pará. Para análise das amostras de soro foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), utilizando 17 sorovares de *Leptospira* sp., considerando-se reagentes as amostras cujo título fosse igual ou superior a 100. A técnica de PCR foi usada para analisar as amostras de sangue total, fígado, rim e urina. A ocorrência de amostras de soro reagentes foi de 45% (18/40) e os sorovares mais prevalentes foram Pomona (31,6%) e Hardjo CTG (31,6%). Na PCR 32,5% (13/40) das amostras foram positivas, sendo 10 em amostras de rim, 2 em amostras de rim e fígado simultaneamente e 1 em amostra de fígado. Todas as amostras de sangue total e urina foram negativas. A análise das duas técnicas em conjunto, bem como o uso da PCR nas diferentes amostras, permitiu identificar a provável fase de infecção em que se encontravam os animais, além de ressaltar a importância do uso dessas técnicas de forma complementar no diagnóstico da leptospirose. Os resultados obtidos comprovam a participação dos búfalos no ciclo epidemiológico da leptospirose, inclusive como portadores renais do agente.

Palavras-chave: PCR, soroaglutinação microscópica (SAM), rim, fígado, urina.

SEROLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS of *Leptospira* sp. IN BUFFALO (*Bubalus bubalis*) SLAUGHTERED FROM SOURE, MARAJÓ ISLAND, PARÁ, BRAZIL.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis of worldwide distribution caused by bacteria the genus *Leptospira* that may compromise the health of buffalo herds, developing reproductive problems and consequently economic losses. The aim of the study was to determine the occurrence of *Leptospira* sp. in samples of serum, whole blood, kidney, liver and urine, these materials were obtained from slaughtered buffalo in the municipality of Soure, Marajó Island, Pará. For analysis of serum samples was used microscopic agglutination technique (MAT) with 17 *Leptospira* sp. serovars, considering reagents samples whose title was equal or higher than 100. The PCR technique was used to analyze samples of whole blood, liver, kidney and urine. The occurrence of seropositive samples was 45% (18/40) and the most prevalent serovars were Pomona (31.6%) and Hardjo CTG (31.6%). In PCR 32.5% (13/40) of the samples were positive, with 10 samples from kidney, two samples from kidney and liver simultaneously, and only one from liver. All samples of whole blood and urine were negative. The analyzes of the two techniques together, as well as the use of PCR in the different samples, allowed to identify the probable stage of infection in which the animals were, in addition to highlighting the importance of using these techniques in the diagnosis of leptospirosis. The results confirm the participation of buffaloes in the epidemiological cycle of leptospirosis, even as kidney agent carriers.

Keywords: PCR, microagglutination test (MAT), kidney, liver, urine.

4.1 – INTRODUÇÃO

A bubalinocultura no Brasil é uma prática rentável, além de estar em plena expansão. Os búfalos são animais rústicos e resistentes, porém suscetíveis a diversas enfermidades infecciosas que podem comprometer a sanidade do rebanho, causar prejuízos econômicos, além de causar danos a saúde pública. Dessa forma, estudos sobre doenças infecciosas que acometem os bubalinos, principalmente a leptospirose, são essenciais para determinar medidas sanitárias específicas (BERNARDES, 2007). De acordo com dados da Pesquisa da Produção Pecuária Municipal (IBGE, 2011) o estado do Pará possui aproximadamente 485.033 cabeças de bubalinos, sendo que 64% (311.664) desse efetivo se encontra na Ilha do Marajó que possui o maior rebanho dessa espécie no Brasil.

A leptospirose é uma zoonose causada por uma bactéria espiroqueta do gênero *Leptospira*, que pertence à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (LEVETT, 2001). É considerada um problema de saúde pública mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais úmidas, onde estão localizados a maioria dos países em desenvolvimento. Quando comparado a países de clima temperado, o problema nessas regiões é maior, não somente pelas questões ambientais e climáticas, mas também pelas condições precárias de habitação e saneamento básico (WHO, 2003).

A infecção é dividida basicamente em duas fases: aguda e crônica ou convalescente. A leptospira penetra no organismo nos pequenos ferimentos cutâneos, mucosas ou ainda na pele molhada, ocorrendo disseminação da bactéria na corrente circulatória, podendo se multiplicar em vários tecidos, principalmente no fígado (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Após essa fase inicial, os mecanismos imunológicos reduzem a quantidade de leptospiros na circulação que ficam em maior concentração nos tecidos, principalmente nos rins onde ficam aderidas no epitélio dos túbulos renais, se multiplicando e sendo eliminadas na urina de forma intermitente, caracterizando a fase crônica de portador renal e de leptospiúria (LEVETT, 2001).

Em propriedades rurais, roedores sinantrópicos e animais silvestres podem atuar como fonte de disseminação e manutenção das leptospiros no ambiente, pois devido a grande oferta de alimentos, esses animais convivem muito próximos aos animais de

produção (CHIEBAO, 2010). Os bovinos também podem ser responsáveis pela manutenção das bactérias nas propriedades, sendo considerados importantes disseminadores da doença para humanos e outros animais (VASCONCELLOS, 1997).

Em animais de produção, a leptospirose ocasiona desordens reprodutivas, tais como nascimento de animais debilitados, abortamentos, natimortos, repetições de cio, mastite, além de problemas como nefrite e condenação de vísceras após inspeção veterinária (FAINE et al, 1999; SANTA ROSA et al, 1961; SANDOVAL et al, 1979). As perdas econômicas causadas pela leptospirose estão ligadas as falhas reprodutivas, queda da produção de leite e carne e custos com medicamentos, assistência veterinária, vacinas e exames laboratoriais (FAINE et al, 1999). Em bubalinos, o aborto devido a infecção por *Leptospira* sp. ocorre como consequência de infecção sistêmica, podendo ocorrer ainda na fase aguda da doença, mas geralmente ocorrem no terço final da gestação (NARDI et al, 2006).

Para confirmação do diagnóstico clínico e epidemiológico da leptospirose podem ser usados métodos sorológicos e moleculares (LEVETT, 2001) e diversos estudos demonstram que, por detectarem a doença em estágios e fases distintos, tais métodos podem fornecer resultados discordantes, porém complementares (BAL et al., 1994; FONSECA et al., 2006; OOTEMAN et al., 2006; KOSITANONT et al., 2007). Atualmente, a soroaglutinação microscópica (SAM) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA de *Leptospira* sp., são as ferramentas mais importantes no diagnóstico da infecção. Esses testes possuem vantagens e desvantagens e o desempenho de cada um varia conforme diversos fatores, principalmente com relação a fase da infecção (SCHULLER et al., 2015).

A SAM é o teste sorológico de referência no diagnóstico laboratorial da leptospirose, recomendado pela Organização Mundial da Saúde, além de ser utilizado também em inquéritos soroepidemiológicos. Embora seja um teste sensível e específico na detecção de anticorpos contra *Leptospira* sp., a SAM possui baixa sensibilidade na identificação do sorovar infectante, indicando apenas o provável sorogrupo no qual o sorovar infectante está incluído (LEVETT, 2001; WHO, 2003; SYKES, et al, 2011). Com relação a sua interpretação, não é possível afirmar que os animais reagentes estejam realmente infectados, pois a presença de anticorpos não indica infecção ativa, existindo

a necessidade de sorologias pareadas para verificar a soroconversão e fazer uma interpretação segura. Por outro lado, resultados negativos não excluem a possibilidade de infecção devido a necessidade da produção de anticorpos pelo animal que pode levar de 7 a 10 dias após o contato com o agente, além disso os portadores (fase crônica) podem apresentar títulos abaixo dos níveis detectáveis (WHO, 2003). No Brasil esse teste é amplamente utilizado por diversos pesquisadores para verificar a ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* sp. em bubalinos nas diversas regiões do país e as frequências variam entre 6,7 e 85,4% (SANDOVAL et al., 1979; GIORGI et al., 1981; LANGONI et al., 1999; FAVERO et al.; 2002; DIAS et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizado no diagnóstico da leptospirose por meio da detecção e amplificação do DNA de *Leptospira* sp. de diversos tecidos ou fluidos corpóreos (WHO, 2003). A escolha do tipo de amostra depende da fase da infecção, já que as leptospirosas podem ser encontradas em diferentes momentos do diagnóstico. No sangue é possível encontrá-las nos primeiros 10 dias após o contato com o agente e esse evento caracteriza a fase de leptospirose, sendo que após esse período é possível encontrar seu material genético na urina que caracteriza a fase de leptospirose. Entretanto, podem ocorrer variações dependendo da resposta imune do hospedeiro e o tipo de leptospirose infectante. Após a morte do animal, é possível utilizar a técnica de PCR em amostras de tecidos, sendo que durante a fase crônica da infecção o rim é o tecido de eleição para a colonização por leptospirosas, já na fase de leptospirose o fígado é o órgão mais comumente afetado. As técnicas convencionais de PCR não são capazes de identificar o sorovar infectante (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; SCHULLER et al., 2015).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* sp. em búfalos abatidos em frigorífico e verificar a participação de animais sorologicamente positivos e negativos, na fase aguda e crônica, usando fragmentos de rim e fígado e amostras de sangue total e urina, pela técnica de PCR, bem como comparar a interpretação dos resultados entre as provas de SAM e PCR nas diferentes amostras.

4.2 – MATERIAL E MÉTODOS

4.2.2 Área do estudo

A ilha do Marajó pertence ao estado do Pará, sendo considerado o maior arquipélago flúvio-marítimo do mundo, localizada a aproximadamente 80 km da capital Belém. As amostras foram colhidas em Soure que tem 24.286 habitantes e é considerado o maior município da Ilha da Marajó, possuindo a segunda maior população de búfalos, estimada em 60.226 animais (Figura 6). O clima predominante é equatorial, quente e úmido com média de 27°C e não existe período seco definido, com chuvas abundantes no período de dezembro a maio e menos chuvoso de junho a novembro. A precipitação pluvial anual é 3000 mm (IBGE, 2011).

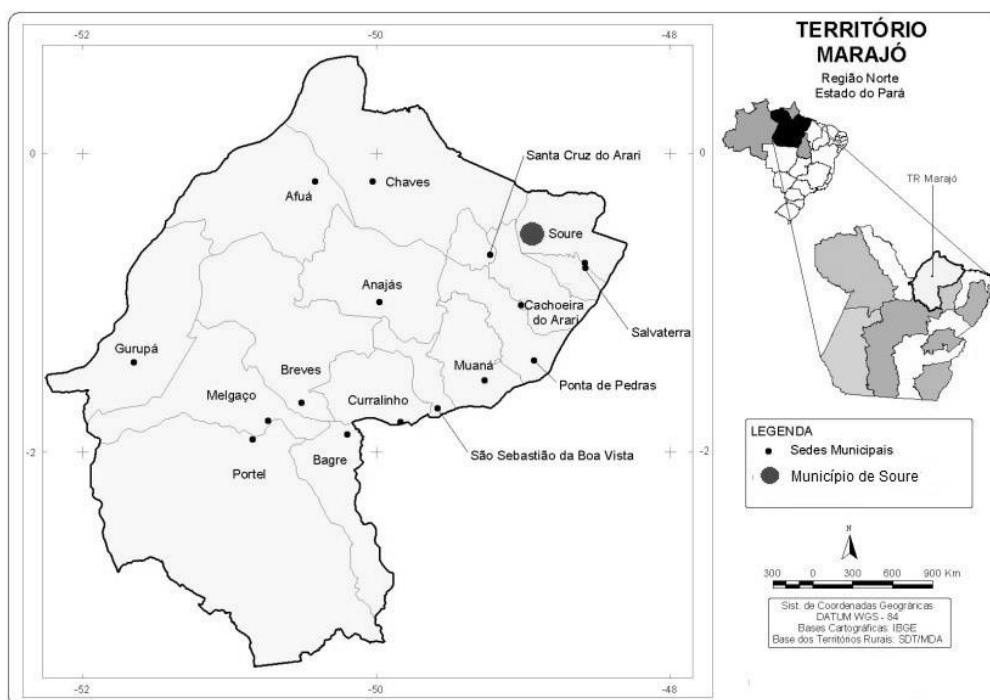


Figura 6 - Localização do município de Soure na Ilha do Marajó – PA, Brasil.

4.2.3 Colheita de amostras

Foram colhidas 40 amostras de sangue total, soro, fragmentos de fígado e rim, além de 7 amostras de urina de carcaças de búfalos, machos e fêmeas, abatidos no Abatedouro Municipal de Soure, todos provenientes de propriedades desse município.

As amostras de sangue foram coletadas diretamente do animal no momento da sangria em tubos com e sem anticoagulante com capacidade de 4 mL de sangue. Para a obtenção de soro, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 15 minutos. Os soros sobrenadantes foram aspirados e aliqüotados em tubos cônicos tipo eppendorf com capacidade para 1,5 mL, assim como as amostras de sangue total. Todas as amostras foram congeladas a -20° C para posterior processamento.

4.2.4 Soroaglutinação Microscópica

A presença de anticorpos contra *Leptospira* sp. no soro dos animais foi realizado por meio do teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) no Núcleo de Pesquisas em Zoonoses da UNESP Campus Botucatu. Foram considerados reagentes títulos ≥ 100 e a ocorrência de reação cruzada ou co-infecção (WHO, 2003), utilizando-se 17 antígenos de *Leptospira* sp. (Quadro 1)

QUADRO 2 - ANTÍGENOS DE *Leptospira* sp. UTILIZADOS NA TÉCNICA DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM) EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE BÚFALOS DO MUNICÍPIO DE SOURE, ILHA DO MARAJÓ, PARÁ.

Sorogrupo	Sorovar
Australis	Bratislava
Canicola	Canicola
Djasiman	Djasiman
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
	Icterohaemorrhagiae
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo
	Wolffi
	Hardjo Prajtino
	Hardjo Minis
	Hardjo CTG
	Hardjo Bovis
	Guaricura
Ballum	Castellonis
Shermani	Tarassovi
Grippotyphosa	Grippotyphosa

Para a prova de triagem, as amostras de soro foram diluídas a 1:50, utilizando-se 100µL de soro e 4.9 mL de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) pH 7,6. Em microplacas, devidamente identificadas e marcadas, distribuiu-se 25 µL do soro diluído e adicionou-se 25 µL dos sorovares, passando a diluição final em cada poço para 1:100. O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra de controle negativo. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C durante duas horas. A leitura foi realizada diretamente na microplaca em microscópio de campo escuro, considerando reagentes as amostras que apresentaram no mínimo 50% de aglutinação.

A prova de titulação foi realizada com as amostras positivas na prova de triagem e apenas com os sorovares reagentes. A partir da diluição 1:100, as amostras foram diluídas em razão 1:2 até a diluição de 1:3200. Após a incubação por 2 horas, a leitura é realizada conforme descrito na prova de triagem, considerando como título a maior

diluição do soro capaz de aglutinar 50% ou mais das leptospiras em comparação com o controle negativo.

4.2.5 Reação em cadeia da polimerase

Amostras de sangue total, urina e fragmentos de fígado e rim foram utilizadas para a reação PCR. A extração de DNA foi realizada utilizando o PureLink Genomic DNA Kit, conforme recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas em fluorômetro QuBit (Invitrogen, USA) e a integridade do DNA foi verificada utilizando gel de agarose a 0,8% corado com SyBr Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA). Para o controle positivo da extração foi utilizado uma cepa de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, mantida em meio EMJH, previamente centrifugada (3000 rpm por 10 minutos) e ressuspensa 2 vezes em PBS pH 7,6 estéril. Água Miliq foi utilizada como controle negativo.

Para amplificação do DNA de *Leptospira* sp., foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos descritos por Mérien et al. (1992), os quais amplificam 331 pb conforme segue: LEP 1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3') e LEP 2 (5' TTCCCCCATTGAGCAAGATT 3').

A amplificação do DNA foi realizada de acordo com protocolo adaptado descrito por Mérien et al. (1992). As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL com volumes totais de 25 μ L, sendo 2,5 μ L de solução tampão de PCR (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0), 0,75 μ L de MgCl₂ (1,5mM), 0,5 μ L de solução de dNTP (0,2mM), 0,2 μ L de *Taq Platinum* DNA (1U) (Invitrogen, USA), 1,5 μ L de cada iniciador (10 μ M), 15 μ L de água ultrapura e 3 μ L de DNA da amostra extraída.

A reação de amplificação foi feita em termociclador Veriti (Life Technology), com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min., anelamento a 63°C por 1 min. e meio e extensão a 72°C por 2 min, incluindo-se 10 min. adicionais a 72°C, para completar a extensão dos segmentos amplificados.

Os produtos da amplificação foram submetidos a técnica de eletroforese. Preparou-se gel de agarose a 1% corado com SyBr Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA). Foram aplicados 10 μ L do produto de PCR e como marcador de peso molecular foi utilizado o 100 pb ladder (Invitrogen, USA). O gel foi submetido a corrida

eletroforética em cuba contendo TBE 1 X (0,1M Tris, 0,09 M de ácido bórico e 0,001 M de EDTA) e a voltagem de 60V por aproximadamente 1h. O gel foi visualizado no Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia, Brasil).

4.3 – RESULTADOS

4.3.1 – Soroaglutinação microscópica

Dentre as amostras de soro analisadas pela SAM, 45% (18/40) foram reagentes para pelo menos um dos 17 sorovares testados. Foram considerados como reagentes os títulos ≥ 100 , além da ocorrência de reação cruzada e/ou co-infecção, ou seja, quando o animal está infectado com mais de um sorovar.

Dentre os sorovares testados, os prováveis mais prevalentes foram Pomona e Hardjo CTG, ambos com 31,6% de prevalência e o maior título encontrado foi de 1:800 nos sorovares Pomona e Grippytyphosa conforme Tabela 5.

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DE TÍTULOS DE ANTICORPOS E SOROVARES PELO TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM) EM AMOSTRAS REAGENTES PARA *Leptospira* sp. EM BÚFALOS PROVENIENTES DE ABATEDOURO NO MUNICÍPIO DE SOURE, PARÁ, BRASIL, 2015.

Sorovar	Título de Anticorpo (número de amostras)	Frequência (%)
Pomona	100 (1) 200 (2) 400 (2) 800 (1)	6 (31,6%)
Hardjo CTG	100 (1) 200 (1) 400 (4)	6 (31,6%)
Grippytyphosa	100 (2) 400 (1) 800 (1)	4 (21%)
Hardjo Prajino	100 (3)	3 (15,8%)
Total	100 (7) 200 (3) 400 (7) 800 (2)	19 (100%)

4.3.2 – PCR para *Leptospira* sp.

Dentre os 40 búfalos avaliados, 13 (32,5%) foram positivos na PCR, sendo 10 em amostras de rim, 2 em amostras de rim e fígado simultaneamente e 1 em amostra de fígado. Todas as amostras de sangue total e urina foram negativas.

4.3.3 – Relação entre as técnicas e as diferentes amostras utilizadas

Dos 40 búfalos estudados, 23 (57,5%) foram positivos em pelo menos um tipo de amostra, seja na SAM ou na PCR e 17 (42,5%) foram negativos em todas as amostras e/ou testes utilizados.

Comparando o resultado da PCR nas 7 amostras de urina com os outros testes em amostras de animais correspondentes, 3 foram positivos apenas na SAM; 1 foi positivo na SAM e na PCR de rim e 3 negativos em todos os testes. Nenhuma amostra de fígado correspondente foi positiva na PCR.

Na Tabela 6 estão os resultados considerando apenas os animais positivos em pelo menos um dos testes ou um tipo de amostra.

TABELA 6 - RESULTADO DOS 23 BÚFALOS POSITIVOS PARA *Leptospira* sp. EM PELO MENOS UMA DAS AMOSTRAS DE RIM E FÍGADO PELA TÉCNICA DE PCR OU AMOSTRA DE SORO UTILIZANDO A TÉCNICA DE SAM.

SAM	PCR Fígado	PCR Rim	Nº de animais
+	+	+	2
+	+	-	1
+	-	+	5
+	-	-	10
-	-	+	5
Total			23

4.4 – DISCUSSÃO

Esse trabalho verificou a presença de anticorpos contra *Leptospira* sp. em búfalos abatidos no Abatedouro Municipal de Soure, sendo todos os animais provenientes de propriedades localizadas nesse município. Segundo ADLER; MOCTEZUMA (2010), títulos ≥ 400 no teste de soraglutinação microscópica (SAM), na presença de sinais clínicos, é indicativo de infecção ativa, porém títulos menores indicam o contato prévio do animal com a *Leptospira* sp. ou ainda animais em fase inicial da infecção. De um total de 40 amostras analisadas, 18 (45%) foram reagentes na SAM, indicando a presença do agente entre as propriedades do município de Soure, inclusive com títulos ≥ 400 .

Estudos recentes foram realizados em outros países para determinar a ocorrência de *Leptospira* sp. em búfalos utilizando o teste de SAM, sendo a ocorrência de amostras reagentes nesse estudo (45%) maior que a encontrada por GIRALDO et al. (2014); KONRAD et al. (2013); KENAR; OZDEMIR (2013); SUWANCHAROEN et al. (2013) e ADESIYUN et al. (2009) que obtiveram frequência de 37,3%, 22,2%, 32,26%, 30,5% e 14,6% em búfalos da Colômbia, Argentina, Turquia, Tailândia e Trinidad e Tobago, respectivamente.

No Brasil, em estudos realizados no estado de São Paulo, SANDOVAL et al. (1979); GIORGI et al. (1981); FAVERO et al. (2002) e LANGONI et al. (1999), encontraram 6,9%, 6,7%, 43,7% e 37,7% de amostras de soro reagentes, respectivamente, sendo essas frequências inferiores a encontrada no presente estudo. Resultados superiores foram encontrados por CARVALHO et al. (2015) em amostras de soro de búfalos do estado do Maranhão, com 70,58% de animais positivos.

No estado do Pará, DIAS et al. (2014) estudaram 120 rebanhos bubalinos em um total de 4444 animais e VIANA et al. (2009) pesquisaram 212 bubalinos provenientes dos municípios de Soure e Cachoeira do Arari na Ilha do Marajó e Nova Timboteua e Ipixuna do Pará, e encontraram 85,4% e 80% de animais reagentes na SAM, respectivamente. OLIVEIRA et al. (2013) pesquisaram 256 amostras de animais provenientes de três regiões do Baixo Amazonas, Ilha do Marajó e do município de Xinguara e encontraram 34,37% de animais positivos. De acordo com VIANA et al.

(2009) essas altas ocorrências podem ser atribuídas principalmente ao manejo sanitário ineficiente dos rebanhos bubalinos na região amazônica, tais como falta de diagnóstico rotineiro e controle deficiente, ausência de vacinação e falta de tratamento ou descarte de animais positivos. Esses achados demonstram a importância da leptospirose para a região, incluindo a Ilha do Marajó, e a necessidade de medidas sanitárias específicas para evitar perdas econômicas nos rebanhos bubalinos e danos a saúde pública.

As diferenças na ocorrência de anticorpos encontradas no presente estudo (45%) quando comparadas aos demais trabalhos realizados no Brasil e em outros países, podem ter ocorrido devido a vários fatores, tais como: presença de reservatórios nas propriedades, clima, tipo de produção, manejo alimentar, programa de vacinação, além das diferentes técnicas de manejo sanitário realizado em cada propriedade (ANDERSON, 2007). Além disso, amostras sorológicas colhidas em animais provenientes de abatedouro não representam amostragem adequada para estudo de prevalência em uma determinada região, mas refletem uma visão geral da ocorrência e podem sugerir quais os sorovares mais importantes na região de origem dos animais (SHIMABUKURO et al., 2003).

O conhecimento sobre os sorovares prevalentes e seus hospedeiros de manutenção é essencial para o entendimento da epidemiologia da doença em uma determinada região (LEVETT, 2001). CARVALHO et al. (2015) e KONRAD et al. (2013) em estudo com búfalos provenientes do estado do Maranhão e da Argentina respectivamente, encontraram Pomona com maior prevalência, semelhante aos achados do presente estudo. BRASIL et al., 2015 encontraram o sorovar Pomona como o segundo mais prevalente em búfalos provenientes da Paraíba, região nordeste do Brasil. KENAR; OZDEMIR (2013) encontraram o sorovar Hardjo Prajtino como sendo o mais prevalente, concordando parcialmente com os achados do presente estudo, onde esse sorovar aparece como o terceiro mais encontrado. No estado do Pará, SILVA et al. (2009), encontraram o sorovar Hardjo Prajtino com maior prevalência. Outros estudos no estado do Pará demonstraram os sorovares Hardjo e Wolffi como mais prevalentes (DIAS et al., 2014; VIANA et al., 2009). No estado de São Paulo, os sorovares Hardjo e Wolffi também aparecem entre os mais prevalentes (FAVERO et al., 2002; LANGONI et al., 1999). Em outros países, variados sorovares são encontrados em maior

prevalência: Grippytyphosa e Hardjo na Colômbia (GIRALDO et al., 2014) e Copenhageni em Trinidad e Tobago (ADESIYUN et al., 2009). É importante ressaltar que os sorovares Hardjo, Hardjo Prajino e Wolffi, encontrados em maior prevalência na maioria dos estudos acima citados, pertencem ao sorogrupo Sejroe. Sabe-se que o abortamento em bubalinos pode ocorrer devido a infecção por *Leptospira* sp. de maneira semelhante ao que acontece em bovinos (FAINE et al., 1999), sendo os sorovares Pomona e o sorogrupo Sejroe, onde estão os sorovares Hardjo e suas variáveis, descritos como causadores de aborto nessa espécie (LEVETT, 2001). Além do aborto, essas soroviedades também são conhecidas por sua elevada patogenicidade, podendo causar icterícia, hemorragias e morte, tanto em animais quanto em seres humanos (FAINE et al., 1999; CHIEBAO, 2010). Dessa forma, ressalta-se a importância da infecção por esses sorovares, que foram encontrados em maior prevalência no presente estudo, inclusive com possíveis danos a saúde pública e riscos para as pessoas que manuseiam esses animais, seja nas fazendas ou no contato durante o abate.

As diferenças na prevalência dos sorovares são esperadas nas diferentes localizações geográficas e até mesmo em rebanhos distintos de uma mesma região, pois dependem do grau e o tipo de exposição aos diferentes reservatórios da *Leptospira* sp., sejam eles animais domésticos, silvestres ou sinantrópicos. Além disso, fatores ambientais, ocupação, práticas agrícolas e o número e tipo de sorovares utilizados no teste de soroaglutinação microscópica também podem influenciar na prevalência dos diferentes sorovares (BHARTI, et al., 2003). Com relação a esse último fator, é necessário que se utilize o maior número de antígenos possíveis no teste de SAM para obter informações detalhadas sobre a epidemiologia do local e evitar resultados falso-negativos.

Todas as amostras de urina do presente estudo foram negativas na PCR, entretanto esses resultados não excluem a possibilidade de infecção e eliminação de leptospiros no ambiente. Os resultados negativos nesse caso podem ocorrer devido a presença de substâncias inibidoras da própria urina, tais como ureia e creatinina, além do congelamento da amostra antes da extração do DNA que pode causar lise das bactérias (LUCCHESI et al., 2004). Além desses fatores, existe ainda a possibilidade

das amostras não conterem a bactéria, uma vez que sua eliminação pela urina é intermitente (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Comparando-se os resultados obtidos na sorologia com os obtidos na PCR de urina, três animais foram positivos na SAM e negativos na PCR. Entretanto, a leptospirúria pode não se relacionar aos resultados da SAM, os animais podem eliminar leptospiras na urina já na fase aguda da infecção, antes mesmo da formação de anticorpos detectáveis pela SAM ou ainda na fase crônica quando títulos de anticorpos podem não ser mais detectáveis na sorologia, além disso, a leptospirúria pode ser intermitente (BAL, et al., 1994; SCHULLER, et al., 2015).

As amostras de sangue analisadas através da PCR no presente estudo apresentaram resultados negativos na detecção de DNA de leptospiras. Em experimento com 500 bovinos provenientes da Turquia, GUMUSSOY et al. (2009) utilizaram a PCR em amostras de sangue de animais sororeagentes para *Leptospira* sp. e também não encontraram resultados positivos. Com resultados também semelhantes, FONTANA (2011) em pesquisa realizada com porcos monteiro, utilizou 151 animais e nenhum foi positivo na PCR em amostras de sangue para pesquisa de DNA de *Leptospira* sp. Já ROMANI (2012) em estudo com bovinos na região do Pantanal encontrou resultados positivos na PCR usando amostras de sangue, sendo que dentre os 133 animais sororeagentes 2 foram positivos na PCR e nos 134 negativos na SAM obteve-se um positivo na PCR. Em experimento com bovinos provenientes de um frigorífico no Iran, AZIZI et al. (2012) obtiveram 7/24 (29,2%) amostras de sangue positivas na PCR. Um resultado positivo utilizando amostra de sangue em conjunto com a presença de sinais clínicos é um forte indício de leptospirose aguda (LEVETT, 2001; SCHULER et al., 2015). Resultados negativos na PCR usando amostras de sangue total podem ocorrer devido a rápida fase de leptospiremia, que se caracteriza pela alta concentração do agente na corrente sanguínea. Dessa forma, a PCR utilizando amostras de sangue é útil para o diagnóstico de *Leptospira* sp. na primeira semana da infecção, ou seja, na fase de leptospiremia ou fase aguda (MÉRIEN et al., 1995; LEVETT, 2001).

Três amostras de fígado (7,5%) foram positivas na PCR indicando a participação dos animais na fase aguda da infecção, sendo o fígado o órgão mais afetado durante a

fase de leptospiremia (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; SCHULLER et al., 2015). De acordo com GREENE et al. (2006) após a primeira semana da infecção ocorre o aumento da produção de anticorpos e com isso a eliminação do agente no sangue e nos tecidos, incluindo o fígado, seguindo-se a fase de colonização renal. BARBANTE (2010) em estudo com ovinos no estado de SP encontrou 7/100 (7%) animais positivos na técnica de PCR utilizando amostras de fígado e FORNAZARI (2012) em estudo com 465 ovinos procedentes dos estados de SP, RS, GO e MS não encontraram animais positivos na PCR em amostras de fígado. O único animal positivo na SAM e na PCR de fígado simultaneamente pode indicar que o animal estava na fase aguda da infecção, provavelmente no final dela, pois já apresentava anticorpos detectáveis (LEVETT, 2001).

Os 12/40 (30%) búfalos positivos em amostras de rim usando a técnica de PCR comprovam o estado de portadores renais de leptospiras. AZIZI et al. (2012) também tiveram sucesso ao analisar 24 rins de bovinos com nefrite intersticial e obtiveram 19 (79,2%) amostras positivas na PCR. O estado de portador renal de leptospiras é o ponto chave na epidemiologia da infecção e da persistência do agente no ambiente (LEVETT, 2001; ADLER, MOCTEZUMA, 2010). Sendo assim os búfalos podem ter uma importante participação no ciclo epidemiológico da leptospirose, atuando como reservatórios de leptospiras. Cinco animais foram positivos na SAM e na PCR de rim simultaneamente indicando a fase crônica com colonização renal e anticorpos ainda detectáveis e 5 animais foram positivos apenas na PCR de rim, o que pode indicar que o animal estava infectado com um sorovar que não foi usado na bateria de antígenos da SAM ou ainda existe a possibilidade dos níveis de anticorpos terem declinado ao ponto de não serem mais detectáveis (LEVETT, 2001).

Dois animais foram positivos simultaneamente na SAM e na PCR em amostras de rim e fígado, indicando que o animal possivelmente se encontra no final da fase de leptospiremia, com leptospiras ainda detectáveis no fígado, e início da fase crônica já com colonização renal pelo agente. Os anticorpos detectáveis pela SAM podem permanecer no animal durante meses ou anos declinando a taxas variáveis conforme a imunidade do animal (LEVETT, 2001).

Os 17/40 (42,5%) animais negativos em todos os testes e tipos de amostras indicam provável ausência de infecção. O fato de 10 animais positivos na SAM serem negativos na PCR em todos os tipos de amostras pode ser explicado por serem animais que tiveram contato prévio com o agente etiológico, mas sem o desenvolvimento de infecção ativa (BOLIN, 1996).

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram a importância da infecção nos búfalos, já que a leptospirose ocasiona desordens reprodutivas e queda na produtividade dos rebanhos acometidos com nascimento de animais debilitados, abortamentos, natimortos, repetições de cio e mastite (FAINE et al, 1999; SANTA ROSA et al, 1961; SANDOVAL et al, 1979). A infecção pode ainda gerar perdas econômicas consideráveis devido as falhas reprodutivas, queda da produção de leite e carne, custos com medicamentos, assistência veterinária, vacinas e exames laboratoriais (FAINE et al, 1999). Além disso, a leptospirose é uma zoonose que representa risco para a saúde pública devido ao seu forte caráter ocupacional no meio rural, podendo ocorrer transmissão para veterinários, trabalhadores rurais que mantêm contato direto com os animais e com o ambiente onde vivem e também para trabalhadores do abatedouro pela manipulação e contato direto com vísceras, sangue e carcaças de animais infectados (LEVETT, 2001; WHO, 2003; AZEVEDO et al., 2004). FANG et al. (2015) relataram a presença de bovinos e ovinos infectados por *Leptospira* sp. em um abatedouro na Nova Zelândia onde 3 funcionários adquiriram a doença e precisaram ser hospitalizados, ressaltando a importância ocupacional da leptospirose e seus riscos para a saúde pública.

4.5 – CONCLUSÃO

Anticorpos contra *Leptospira* sp. foram demonstrados em 18/40 (45%) búfalos de um abatedouro localizado no município de Soure, na Ilha do Marajó, em animais provenientes de fazendas localizadas nesse mesmo município e os prováveis sorovares mais prevalentes foram Pomona e Hardjo CTG. Resultados discordantes entre a SAM e a PCR ressaltam a importância da realização do diagnóstico por meio de diferentes técnicas e em diferentes amostras. Os resultados positivos na PCR utilizando amostras de fígado e rim comprovaram a infecção ativa nesses animais, na fase aguda e/ou

crônica da infecção, além de indicar o estado de portador renal de leptospiras. Sendo assim, os búfalos podem ter importante participação no ciclo epidemiológico da leptospirose atuando como fontes de contaminação para o meio ambiente e fontes de infecção para trabalhadores rurais e funcionários dos abatedouros, o que demonstra sua relevância para a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.
- ADESIYUN, A. A.; JACKSON, C. H.; CLARKE, N. et al. Leptospirosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Veterinarski Arhiv**, v.79, n.1, p.77-86, 2009.
- ANDERSON, M. L. Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. **Theriogenology**, v.68, p.474-486. 2007.
- AZEVEDO, S.S., ALVES, C.J., ANDRADE, J.S.L., SANTOS, J.A., FREITAS, T.D., BATISTA, C.S.A.. Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. **Arquivo Instituto Biológico**. v. 71, p. 383–385, 2004.
- AZIZI, S.; TAJBAKSH, E.; HAJIMIRZAEI, M. R.; GHOLAMI, M.; SADEGHIAN, H.; ORYAN, A. Evaluation of 'white-spotted kidneys' associated with leptospirosis by polymerase chain reaction based *LipL32* gene in slaughtered cows. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 83, p. 1-5, 2012.
- BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BARBANTE, P. **Isolamento e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. em amostras renais e hepáticas de ovinos sorologicamente positivos e negativos para leptospirose, abatidos em frigoríficos, procedentes do Estado de São Paulo**. 2010. Botucatu, 118f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Disease**, v. 3, p. 757-771, 2003.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.
- BOLIN C. A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging diseases of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**, v.11, n.3, p.166-171, 1996.
- BOOM, V., CITTERIO, E., HOOGSTRATEN, D., ZOTTER, A., EGLY, J. M., CAPPELLEN, W. A., et al. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. **The Journal of Cell Biology**, v. 166, p. 27-36, 2004.

CARVALHO, O. S.; GONZAGA, L. N. R.; ALBUQUERQUE, A. S. et al. Occurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. **African Journal of Microbiology Research**, v.9. p.598-603, 2015.

CHIEBAO, D. P. **Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Leptospira spp.* em bovinos do estado do Pará: estudo de possíveis variáveis para ocorrência de infecção**. 2010. São Paulo, 109f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo.

DIAS, H. L. T., ESPINHEIRO, R. F.; ALBUQUERQUE. et al. A serological survey to determine the commonly occurring serovars of *Leptospira sp.* in herds buffaloes in the Para State, Brazil. In: IV Conferência Nacional Sobre Defesa Agropecuária, 2014, Belém. **Anais...** Belém: Defesa Agropecuária e Sustentabilidade, 2014, p. 96-97.

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

FANG, F.; EMERSON, J. M. C.; CULLUM, C.; HEUER, C.; WILSON, P. R.; BENSCHOP, J. Shedding and Seroprevalence of Pathogenic *Leptospira spp.* in Sheep and Cattle at a New Zealand Abattoir. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, -. 258-268, 2015.

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

FONSECA, C. A.; FREITAS, V. L. T.; ROMERO, R.C.; SPINOSA, C.; SANCHES, M.C.A.; SILVA, M. V.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. **Tropical Medicine and International Health**, v.11, p. 1699-1707, 2006.

FONTANA, I. **Avaliação do papel do porco monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do Pantanal sul-mato-grossense**. 2011. Brasília, 61f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Programa de pós graduação em Saúde Animal, Universidade de Brasília.

FORNAZARI, F. **Comparação de técnicas no diagnóstico da infecção leptospírica em ovinos e implicações na saúde pública**. Botucatu, 2012. 100p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.

GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; HERRERO, J.A.; HERNÁNDEZ, A.; GÓMEZ, J. Leptospirosis. **Medicine**, Oxford, v. 10, n. 57, p. 3896-3902, 2010

GREENE, C.E.; SYKES, J.E.; BROWN, C.A.; HARTMANM, K. Leptospirosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3 ed. Saunders Elsevier: St. Louis, 2006. p. 402-416.

GIRALDO, J. L. M.; HOYOS, J. A. C.; GARCIA, I. W. et al. Prevalencia de anticuerpos a *Brucella abortus*, *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* in hatos bovinos y bubalinos em el Departamento de Caquetá, Colombia. **Revista Salud Animal**, v. 36, n. 2, p. 80-89, 2014.

GIORGI, W., TERUYA, J.M., DA SILVA, A.S., et al. Leptospirose: resultados das soroglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974/1980. **Biológico**, v. 47, p. 299-309, 1981.

GONÇALVES, L. M. F; COSTA, F.A.L. Leptospiroses em suínos no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 1, p. 1-14, 2011

GUMUSSOY, K. S.; OZDEMIR, V.; AYDIN, F. et al. Seroprevalence of Bovine Leptospirosis in Kayseri, Turkey and Detection of Leptospire by Polimerase Chain Reaction. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n.6, p.1222-1229, 2009.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2011. Rio de Janeiro. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf Acesso em 19/01/2015.

KENAR, B.; OZDEMIR, V. The seroprevalence of leptospirosis in Anatolian buffaloes in Turkey. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.164, n.6, p.331-335, 2013.

KONRAD, J. L.; CAMPERO, L. M.; CASPE, G. S. et al. Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., and Apicomplexa protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina. **Tropical Animal Health Production**, v.45, p.1751-1756, 2013.

KOSITANONT, U.; RUGSASUK, S.; LEELAPORN, A.; PHULSUKSOMBATI, D.; TANTITANAWAT, S.; NAIGOWIT, P. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 117-122, 2007.

LANGONI, H.; FAVA, C. D.; CABRAL, K. G. et al. Aglutininas antileptospíricas em búfalos do Vale do Ribeira, estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p. 305-307, 1999.

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

LILEMBAUM, 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. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 16-19, 2009.

LUCCHESI, P. M.; ARROYO G. H.; ETCHEVERRIA, A. I.; PARMA, A. E; SEIJO, A. C. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 37, p. 131-134, 2004.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; GIRONS, I. S. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 09, p. 2219-2224, 1992.

MINEIRO, A. L. B. B.; VIEIRA, R. J.; COSTA, E. A.; SANTOS, R. L.; GONÇALVES, L. M. F.; CARVALHO, S. M.; BONFIM, M. R. Q.; COSTA, F. A. L. Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 859-866, 2011.

NARDI JUNIOR, G.; RIBEIRO, M. G.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; JORGE, A. M.; GERONUTTI, L.; MORAIS, Z. M. Perfil de aglutininas anti-*Leptospira* em bezerras búfalas vacinadas com bacterina pentavalente comercial contra leptospirose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58. n. 3, p. 299-304, 2006.

OLIVEIRA, G. C.; SILVA, D. B.; PINHEIRO, V. L. C. et al. Pesquisa de anticorpos anti-leptospíricos em Bubalinos. In: I Simpósio Internacional de Medicina Veterinária Preventiva, 2013, Jaboticabal- SP. **Ars Veterinária**, v. 29, 2013.

OOTEMAN, M. C.; VAGO, A. R.; KOURY, M. C. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 247-257, 2006.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pig and goats**. 10 ed. Saunders Elsevier: St Louis, Cap. 20, 2006. p 1094 - 1109.

ROMANI, A. R. **Investigação soropidemiológica e molecular de brucelose e leptospirose em núcleos de conservação de gado curraleiro pé duro e pantaneiro**. 2012. Goiânia, 92f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás.

SANDOVAL, L. A.; ARRUDA, N. M.; TERUYA, J. M. et al. Pesquisas em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 45, n. 11-12, p. 209-212, 1979.

SANTA ROSA, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; TROISE, C. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de bovinos em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 28, p. 1113-1118, 1961.

SCHULLER, S. FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. E. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p.159-179, 2015.

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

SUWANCHAROEN, D.; CHAISAKDANUGULL, Y.; THANAPONGTHARM, W.; YOSHIDA, S. Serological survey of leptospirosis livestock in Thailand. **Epidemiological infectious**, v.141, p.2269-2277, 2013.

SYKES, J. E.; HARTMANN, K.; LUNN, K. F.; MOORE, G. E.; STODDARD, R. A.; GOLDSTEIN, R. E. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011

VASCONCELLOS, S.A.; BARBARINI JR, O.; UMEHARA, O.; MORAES, Z.M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A. C.M.; FERREIRA NETO, J.S. Leptospirose Bovina. Níveis de ocorrência e sorotipo predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, p. 7-15, 1997.

VIANA, R. B.; FAVA, C. D.; MOURA, A. C. B. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na Amazônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.3, p.453-457, 2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. Malta, 2003.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leptospirose é uma zoonose negligenciada, de distribuição mundial e afeta principalmente pessoas de baixa renda que vivem em grandes centros urbanos com condições de higiene e saneamento básico precários, além de trabalhadores rurais e pessoas envolvidas em atividades de pecuária e agricultura, devido ao contato com grande número de animais. Embora a incidência global da doença seja desconhecida, estima-se que ocorra mais de 500 mil casos da doença em humanos por ano (WHO, 2011). No Brasil, entre janeiro de 2010 e novembro de 2015, ocorreram 24366 casos confirmados de leptospirose humana com taxa de letalidade aproximada de 9% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Os impactos econômicos e sociais causados pela doença ainda são pouco estudados, assim como os custos em gastos hospitalares, perda da produtividade por sequelas e perdas econômicas e mortes em animais de produção (WHO, 2011).

De acordo com estimativas da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos o rebanho nacional dessa espécie atinge mais de 3 milhões de cabeças com taxa anual de crescimento de aproximadamente 10%. No entanto a Pesquisa da Produção Pecuária Municipal (IBGE, 2011) estima que o número de bubalinos no Brasil seja de aproximadamente 1,2 milhões com o maior rebanho localizado na Ilha do Marajó. A bubalinocultura no ambiente amazônico é dinâmica, diversificada e os animais são submetidos a diferentes tipos de manejo que podem variar conforme a situação econômica e social de cada produtor. Essas diferenças podem refletir na ocorrência de inúmeras doenças infecciosas, incluindo a leptospirose.

A alta ocorrência de propriedades na Ilha do Marajó com pelo menos um animal positivo na SAM indica que a bactéria está amplamente disseminada no ambiente e reflete a importância desse agente para a produção pecuária local. O material genético encontrado em amostras de fígado e rim pela técnica de PCR indica infecção ativa nos animais, complementando os resultados encontrados na SAM. Embora não tenha ocorrido resultados positivos na urina, o estado de portador renal de leptospiras é altamente sugestivo de que os animais estejam em fase de leptospirúria e indica a participação ativa desses animais no ciclo epidemiológico da doença. Sendo assim,

novos estudos devem ser conduzidos com o objetivo de analisar os fatores de risco na região para ocorrência da infecção por *Leptospira* sp. e orientar a comunidade local com relação aos riscos para saúde pública e determinar medidas sanitárias específicas para a região para o controle da infecção nos animais e seres humanos.

REFERÊNCIAS

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2011. Rio de Janeiro. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf Acesso em 19/01/2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em 18/01/2016.

WHO – World Health Organization. Leptospirosis: **an emerging public health problem**. Weekly epidemiological record, v. 86, n. 6, p. 45-52, 2011.

7. ANEXOS

7.1 - Certificado de aprovação em Comissão de Ética – UFPR



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 005/2015, referente ao projeto “Diagnóstico de *Leptospira* sp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) na ilha do Marajó, Pará, Brasil”, sob a responsabilidade de Marcelo Beltrão Molento, na forma em que foi apresentado (utilização de 260 animais e como grau B de invasividade), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Brasil, em reunião realizada dia 13 de março de 2015.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 005/2015, regarding the project “Diagnosis of *Leptospira* sp. in buffaloes (*Bubalus bubalis*) on the island of Marajó, Pará, Brazil”, under Marcelo Beltrão Molento supervision, in the terms it was presented (use of 260 animals and was classified as grade B of invasiveness), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Brazil) during session on March 13, 2015.

Curitiba, 13 de Março de 2015.


Ananda Portella Félix
Presidente CEUA-SCA


Simone Tostes de Oliveira Stedile
Vice-Presidente CEUA-SCA

7.2 – Certificado resumo apresentado ao 42º CONBRAVET – 2015



7.3 – Certificado resumo apresentado ao 42º CONBRAVET – 2015



7.4 – Resumo apresentado no WAAVP – Liverpool - 2015

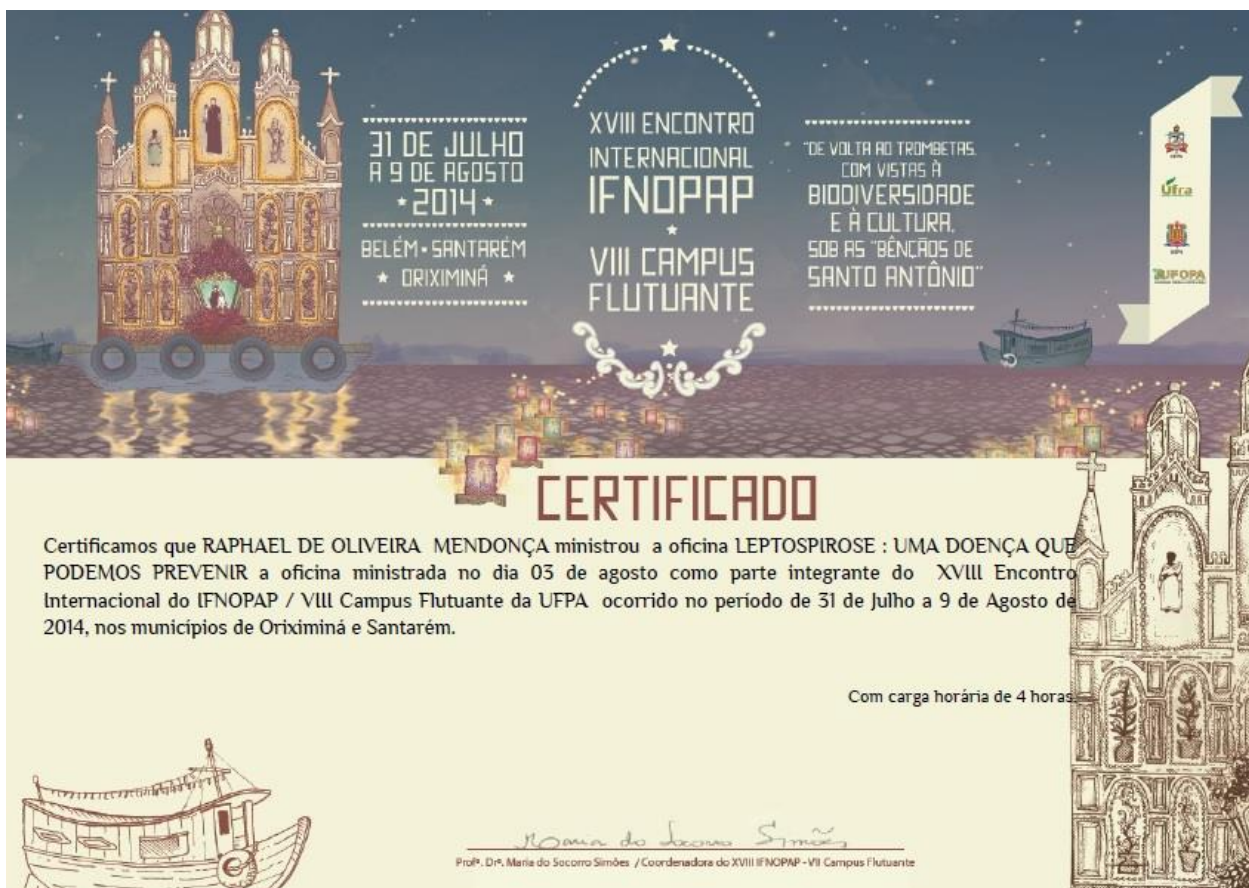
Body growth and development of Thoroughbred horses naturally infected with Cyathostomins

Carolina Abrahao¹, Luciana Dias de Castro¹, Cristina Miyazaki¹, Douglas Vieira¹, Andreia Buzatti¹, Raphael Mendonça¹, Joaquim Antunes², Marcelo Molento^{1,3}

¹Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brazil, ²Haras Sao Jose da Serra, Sao Jose, PR, Brazil, ³National Institute of Science and Technology, Belo Horizonte, MG, Brazil

Parasite infections are responsible for important economic losses in horse farming, either directly in animals that develop clinical signs or indirectly by body condition loss and performance. The objective of this study was to evaluate the body growth and development of horses naturally infected with cyathostomins. The survey was conducted from August 2014 to January 2015 with 30 Thoroughbred horses (21 females and 9 males), eight to twelve months of age and naturally infected with >98% of cyathostomins. The animals belonged to the Sao Jose da Serra Stud, in Sao Jose dos Pinhais, Brazil. Weight and height data and stool samples were collected monthly. The faecal egg count (EPG) exam was performed with the mini-FLOTAC technique with the sensitivity of 10x. All animals were dewormed with ivermectin plus pyrantel in September as a routine spring-preventive treatment. From August to January, the weight gain and the monthly growth of the animals was on average 16.6; 28.2; 20.9; 14.0; and 17.3 kg and of 1.9; 1.6; 1.0; 1.6; and 0.3 cm, respectively. The five-month EPG average was 291.0; 0.0 (IVM+PYR treatment); 635.7; 1230.7; 986.0; and 2064.7. Although the highest monthly weight gain was observed in September ($p < 0.00$), the month in which the animals had zero EPG, it did not improve the growth of the foals. There was no correlation ($p > 0.05$) between EPG and body growth during the period. The EPG did not differ between males and females and did not affect their development when evaluated separately.

7.5 – Certificado palestra ministrada no XVIII IFNOPAP – 2014



7.6 - VITA

Raphael de Oliveira Mendonça é médico veterinário formado pela Universidade Anhembi Morumbi – SP, em 2012. É pós-graduado em clínica e cirurgia de animais silvestres pela ANCLIVEPA – SP. Tem experiência na área de Medicina Veterinária Preventiva, com ênfase em Saúde Pública Veterinária, atuando nos temas: doenças infecciosas, epidemiologia e zoonoses. Além disso, atua com atendimento clínico a cães, gatos e animais silvestres mantidos como pet.