

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LOUISE KRUEGER

DETECÇÃO E PREVALÊNCIA DE HEMOPLASMAS E *Leptospira* spp. EM
BUBALINOS NO ESTADO DO PARANÁ

CURITIBA

2022

LOUISE KRUEGER

DETECÇÃO E PREVALÊNCIA DE HEMOPLASMAS E *Leptospira* spp. EM
BUBALINOS NO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Coorientador: Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA

Krueger, Louise

Detecção e prevalência de hemoplasmas e *Leptospira spp.*
em bubalinos no estado do Paraná. / Louise Krueger. – Curitiba,
2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

Coorientador: Alexander Welker Biondo.

Bibliotecário: Fernando Cavalcanti Moreira CRB-9/1665



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LOUISE KRUEGER** intitulada: **Deteção e prevalência de hemoplasmas e Leptospira spp. em bubalinos no estado do Paraná**, sob orientação do Prof. Dr. IVAN ROQUE DE BARROS FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

11/04/2022 09:02:12.0

IVAN ROQUE DE BARROS FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

11/04/2022 06:38:27.0

VIVIEN MIDORI MORIKAWA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SAÚDE COLETIVA)

Assinatura Eletrônica

10/04/2022 17:20:47.0

LOUISE NICOLLE BACH KMETIUK

Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 173104

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 173104

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter guiado a minha jornada até o presente momento, me concedido uma vida repleta de amor, saúde e pessoas especiais.

Agradeço com carinho especial aos meus pais, Klaus Gustavo Krueger e Iracema Bauer Krueger, que sempre me apoiaram e incentivaram nas minhas decisões, sonhos e conquistas. Vocês não mediram esforços para me educar e, sem os conselhos, puxões de orelha e ensinamentos eu não teria chegado até aqui. Vocês sempre me encorajaram a seguir em frente e são meus maiores exemplos.

Ao meu irmão, Gustavo Krueger, agradeço pelo companheirismo e amizade que temos.

Ao meu companheiro Pedro Coradassi, pela parceria, paciência e por me incentivar a dar o melhor de mim. Agradeço todos os dias por ter você ao meu lado.

Aos meus amigos e colegas que compartilharam momentos especiais comigo e sempre torceram por mim.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte desses dois anos de pós-graduação, mas que mesmo com o ensino a distância e o contato menor que o esperado deixaram seus ensinamentos.

Ao meu orientador, professor Ivan Roque de Barros Filho, sou muito grata pela paciência e troca de conhecimentos. A pandemia não deixou com que nós convivêssemos mais, mas agradeço-lhe por ter acreditado em mim, por estar sempre disposto a ajudar, pelos conselhos, correções e por ter aberto novas oportunidades para o meu futuro.

Ao meu coorientador professor Alexander Welker Biondo, agradeço pela ajuda e disposição, apesar do pouco contato que tivemos. Obrigada por ceder materiais e possibilitar o andamento do experimento.

Um agradecimento especial à Amanda Haisi, que disponibilizou seu tempo e com muita paciência me ajudou no diagnóstico de hemoplasmas em búfalos. Sua receptividade, calma e amizade foram de grande valia durante a minha breve estadia em Botucatu. Agradeço também pela gentileza e paciência

dos seus colegas de laboratório, ao professor responsável e à UNESP por ceder o espaço e infraestrutura para a realização da pesquisa.

À equipe do Instituto Biológico de São Paulo, em especial à Vanessa Castro, agradeço pela parceria e pelo auxílio no diagnóstico de anticorpos para *Leptospirose* spp. em búfalos.

Agradeço por fim ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR e também à Agência CAPES-DS pelo suporte com a bolsa de mestrado durante estes dois anos.

RESUMO

Búfalos são animais rústicos que podem ser explorados para a produção de carne ou leite. Acredita-se que os bubalinos sejam mais resistentes a algumas doenças, mas ainda há poucos estudos epidemiológicos abrangendo doenças infecciosas como a hemoplasmose e leptospirose nesses animais. O objetivo deste trabalho é determinar a prevalência de hemoplasmose e leptospirose em rebanhos bubalinos provenientes do estado do Paraná, para poder determinar o perfil sanitário dos rebanhos quanto a estas enfermidades. Para determinação da prevalência de hemoplasmose nos búfalos, foram coletadas amostras de sangue de 138 animais provenientes de seis municípios do estado do Paraná. Em 92,02% (127/138) dos búfalos, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram detectados *Mycoplasma* spp. e no sequenciamento genético foram identificadas as espécies *Mycoplasma wenyonii* e '*Candidatus* *Mycoplasma haemobos*'. Foram analisadas 296 amostras de sangue de búfalos, provenientes de 16 municípios do Paraná, oriundos de 22 propriedades, para a detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. A prevalência de búfalos sororreagentes no teste de soroaglutinação microscópica foi de 75,67% (224/296). Os sorovares com maior detecção de anticorpos foram o Icterohaemorrhagiae, seguido dos sorovares Hardjo e Pomona. A partir da observação das prevalências encontradas no presente trabalho, podem se tomar medidas de prevenção e controle e pesquisa dos principais fatores de risco para ambas as enfermidades.

Palavras-chave: búfalos; Brasil; leptospirose; micoplasmas hemotrópicos; PCR.

ABSTRACT

Buffaloes are known for being rustic animals that can be farmed for meat or milk production. It is believed that buffaloes are more resistant to some diseases, but there are still few epidemiological studies covering infectious diseases such as hemoplasmosis and leptospirosis in buffaloes. For this reason, the objective of this study is to determine the prevalence of these diseases in buffalo herds in the state of Paraná, in order to determine the health profile of herds regarding these diseases. To determine the prevalence of hemoplasmosis in herds, blood samples were collected from 138 buffaloes from six municipalities in the state of Paraná. Blood serum samples were used for diagnosis of hemoplasmosis by Polymerase Chain Reaction (PCR). The prevalence of animals infected by *Mycoplasma* spp. was 92.02% (127/138) and *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' species were identified by genetic sequencing. For the detection of antibodies to *Leptospira* spp. samples were collected from 296 samples from 16 municipalities in the state of Paraná, located in different mesoregions of the state. The prevalence of serum-positive buffaloes in the microscopic serum agglutination test was 75.67% (224/296). The serovars with higher antibody detection were Icterohaemorrhagiae, followed by Hardjo and Pomona serovars. From the observation of the prevalence found in the present study, prevention and control measures can be taken and the main risk factors for both diseases can be researched.

Keywords: buffaloes; Brazil; leptospirosis; hemotropic micoplasmas; PCR.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – IMAGEM DE UMA DAS PLACAS DE PCR CONVENCIONAL NA LEITURA EM GEL AGAROSE SOB LUZ DE IMUNOFLUORESCÊNCIA. A IDENTIFICAÇÃO DE CADA AMOSTRA SE ENCONTRA ACIMA DOS POÇOS DE GEL..... 46
- FIGURA 2** – MAPA DO ESTADO DO PARANÁ SUBDIVIDIDO EM MESORREGIÕES EM DIFERENTES CORES. NUMERAÇÃO RESPECTIVA AOS MUNICÍPIOS ONDE FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE SANGUE DE BUBALINOS EM CADA MESORREGIÃO..... 84

LISTA DETABELAS

TABELA 1 – PREVALÊNCIA DE HEMOPLASMOSE EM BUBALINOS EM DIVERSOS PAÍSES DE ACORDO COM TRABALHOS ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	21
TABELA 2 – MESORREGIÃO E MUNICÍPIOS DE ONDE FORAM COLETADAS AS AMOSTRAS DE SANGUE DE BUBALINOS, NÚMERO DE PROPRIEDADES COLETADAS EM CADA MUNICÍPIO E NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS POR MUNICÍPIO.....	43
TABELA 3 – LOCALIZAÇÃO, NÚMERO DE ANIMAIS COLETADOS EM CADA PROPRIEDADE E QUANTIDADE DE ANIMAIS POSITIVOS PARA HEMOPLASMOSE POR MÉTODO DE PCR TEMPO REAL.....	45
TABELA 4 – DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUNS TRABALHOS NA LITERATURA QUE APRESENTAM A PREVALÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM BUBALINOS EM ALGUNS PAÍSES NOS ÚLTIMOS ANOS.....	61
TABELA 5 – SOROPREVALÊNCIA DE LEPTOSPIRA EM BUBALINOS EM DIVERSOS ESTADOS BRASILEIROS.....	61
TABELA 6 – MESORREGIÃO E RESPECTIVOS MUNICÍPIOS DAS PROPRIEDADES VISITADAS PARA COLETA DE AMOSTRAS PARA O PRESENTE ESTUDO, NÚMERO DE PROPRIEDADES VISITADAS POR MUNICÍPIO E NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS POR MUNICÍPIO....	85
TABELA 7 – PREVALÊNCIA DE BUBALINOS PROVENIENTES DO ESTADO DO PARANÁ PARA OS DIFERENTES SOROVARES DE <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. TESTADOS NO PRESENTE ESTUDO.	86
TABELA 8 – NÚMERO DE ANIMAIS SORORREAGENTES PARA DETERMINADO SOROVAR EM CADA PROPRIEDADE UTILIZADA PARA O ESTUDO, DE ACORDO COM O MUNICÍPIO E MESORREGIÃO DA PROPRIEDADE.	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC – Anticorpo

Ct – Número de curvas para reação no qPCR

ELISA – Teste Imunoenzimático

IM – Intramuscular

LGB – Leptospirose Genital Bovina

Nº – Número

pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PV – Peso Vivo

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

SAM – Soroaglutinação Microscópica

Tm – Tempo de dissociação

TPC – Tempo de Preenchimento Capilar

UFPR – Universidade Federal do Paraná

°C – Graus Celsius

® - Marca Registrada

™ - Marca Comercial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
	REFERÊNCIAS	16
2	CAPÍTULO 1: ASPECTOS DA HEMOPLASMOSE EM BÚFALOS - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	INTRODUÇÃO	20
2.2	ASPECTOS DA HEMOPLASMOSE EM BÚFALOS	21
2.2.1	Patogenia	22
2.2.2	Transmissão.....	23
2.2.3	Sinais clínicos.....	26
2.2.4	Diagnóstico.....	28
2.2.5	Tratamento	29
2.3	CONCLUSÃO.....	30
	REFERÊNCIAS	31
3	CAPÍTULO 2: DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPLASMAS EM BÚFALOS NO ESTADO DO PARANÁ	38
3.1	INTRODUÇÃO	40
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.2.1	Comitê de ética	42
3.2.2	Área de estudo	42
3.2.3	Amostragem	43
3.2.4	Extração de DNA	43
3.2.5	PCR em tempo real.....	43
3.2.6	PCR convencional e Sequenciamento Sanger	44
3.3	RESULTADOS	44
3.4	DISCUSSÃO	46

3.5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
4	CAPÍTULO 3: BÚFALOS E ASPECTOS DA LEPTOSPIROSE – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	56
4.1	INTRODUÇÃO	57
4.2	AGENTE ETIOLÓGICO E PATOGENIA	58
4.3	EPIDEMIOLOGIA	59
4.4	TRANSMISSÃO	62
4.5	SINAIS CLÍNICOS.....	64
4.6	DIAGNÓSTICO	64
4.7	CONTROLE E PREVENÇÃO.....	67
	REFERÊNCIAS	70
5.	CAPÍTULO 4: FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Leptospira</i> spp. E SOROVARES PREDOMINANTES EM BÚFALOS (<i>Bubalus bubalis</i>) NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL	80
5.1	INTRODUÇÃO	81
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	83
5.3	RESULTADOS	85
5.4	DISCUSSÃO	88
5.5	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS	93
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que no mundo existam em torno de 204.342.419 bubalinos (FAO, 2019). A população bubalina no Brasil é considerada a maior no continente americano (FAO, 2005). O rebanho brasileiro em 2019 contava com aproximadamente 1.434.141 bubalinos (FAO, 2019), os quais cerca de 32 mil se encontram no estado do Paraná, que continha a oitava maior população de búfalos país (MAPA, 2018; IBGE, 2017). As raças de búfalos mais frequentemente encontradas no Brasil são Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi e Carabao (OLIVEIRA, 2018; COELHO, 2019).

Os búfalos são considerados animais rústicos, e podem ser explorados extensivamente de forma sustentável em locais pouco propícios para outras atividades pecuárias, como áreas de banhados (DAMÉ, 2019). Eles estão distribuídos em todo o território brasileiro, sendo utilizados para tração animal, produção de carne e leite (RAJÃO et al., 2010).

A carne bubalina é considerada de ótima qualidade, e mais acessível economicamente do que a carne bovina (ESMAILNEJAD; NAJAFI; TORFI, 2019). O leite de búfala apresenta algumas peculiaridades em comparação ao leite da vaca, destacando-se a gordura, proteína, sabor adocicado e coloração branca quase opaca, em função da baixa concentração de pigmentos carotenoides (PIGNATA et al., 2014).

Coelho (2019) elaborou um questionário respondido por 29 criadores de bubalinos de 11 estados brasileiros em seu trabalho e obteve a resposta de que a principal atividade comercial praticada pelos que responderam suas perguntas é a produção de leite (75,86%), seguida da criação de animais para corte (34,48%), engorda (34,48%), cria de animais (31,03%), produção e venda de bezerros (20,68%), recria (20,68%), produção e venda de matrizes (17,24%), e outras finalidades (3,44%).

Apesar da importância dos búfalos para a produção de alimentos, diversos aspectos sobre as doenças nestas espécies ainda são desconhecidos (ALBERNAZ et al., 2015). Por possuírem aparência fenotípica semelhante aos

bovinos, frequentemente os búfalos são manejados da mesma forma que estes. Também é comum que se apliquem os conhecimentos que se tem sobre a espécie bovina quando há necessidade de tratamentos e profilaxias para bubalinos (BASTIANETTO, 2009), apesar de os búfalos e bovinos terem suas particularidades individuais (OLIVEIRA, 2018). Existe uma crença de que os búfalos sejam mais resistentes a diversas doenças, embora se saiba que estes podem ser acometidos por diversas enfermidades descritas em bovinos e pequenos ruminantes (DAMÉ, 2019). Apesar disto ainda há poucos estudos epidemiológicos sobre doenças em rebanhos bubalinos no Brasil.

Pouco se sabe sobre a susceptibilidade dos bubalinos brasileiros a várias doenças infecciosas, dentre elas a hemoplasmosse e a leptospirose. Por este motivo, o objetivo deste trabalho é determinar a prevalência destes patógenos em búfalos criados no estado do Paraná. As hipóteses a serem testadas são de que ambos os agentes estão presentes nos bubalinos provenientes do Paraná.

A hemoplasmosse e leptospirose são enfermidades que trazem prejuízos econômicos aos criadores de rebanhos bubalinos infectados. Deste modo, o projeto visa contribuir com informações a respeito da prevalência e susceptibilidade dos búfalos à estas doenças, para que, a partir destes dados, possam ser tomadas medidas preventivas e divulgadas informações aos criadores da região acerca destas doenças.

REFERÊNCIAS

ALBERNAZ, T.T., et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon region, Brazil. **Trop. Anim Health Prod.**, 2015. DOI 10.1007/s11250-015-0884-6

BASTIANETTO, E. Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v., n.6, p.98-103, 2009.

COELHO, A.S. **Cenário da bubalinocultura no Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso (bacharel em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

DAMÉ, M.C.F. Sanidade de Bubalinos no Extremo Sul do Brasil. **EMBRAPA**. Fev. 2019.

ESMAILNEJAD, B., et al. Trypanosoma evansi and “Candidatus Mycoplasma haemolamae” Co-Infection in One-Humped Camel (*Camelus dromedarius*) from the Northwest of Iran: A Case Report. **Iran J. Parasitol.**, v.14, n. 2, p.347-35, 2019.

FAO. FAOSTAT, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> acesso em: 25/03/2021.

FAO. Buffalo production and research, **FAO**, Rome, 2005.

IBGE, 2017 -

https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75659 Acesso em: 05 de setembro de 2020.

MAPA. Dados dos rebanhos bovinos e bubalinos no Brasil em 2017. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2018.

OLIVEIRA, B.P.D. de. **Análise da conjuntura de mercado da Bubalinocultura no Brasil e no estado do Pará**. Monografia (Especialista em Gestão do Agronegócio de Ciências Agrárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

PIGNATA, M.C.A., et al. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.4, n.27, p.226-233, 2014.

RAJÃO, D. de S., *et al.* Estudo da infecção pelo vírus da leucose bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no estado de Minas Gerais. **Rev. Bras. Med. Vet.** v. 32, p.42-45, 2010.

2 CAPÍTULO 1: ASPECTOS DA HEMOPLASMOSE EM BÚFALOS - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMO: Búfalos são animais rústicos que podem ser explorados para a produção de carne ou leite. Estes animais são susceptíveis a enfermidades que também acometem outras espécies de ruminantes, principalmente os bovinos. Entretanto, acredita-se que os bubalinos sejam mais resistentes a algumas doenças, mas ainda há poucos estudos epidemiológicos abrangendo doenças infecciosas como a hemoplasmose em búfalos. A hemoplasmose é causada por micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas, que são bactérias gram-negativas causadoras de anemia hemolítica em hospedeiros imunocomprometidos. *Mycoplasma wenyonii* e '*Candidatus* *Mycoplasma haemobos*' são as principais espécies de hemoplasmas que podem infectar búfalos. A transmissão da doença ocorre principalmente por meio de vetores artrópodes hematófagos ou por via iatrogênica. O diagnóstico de animais infectados é realizado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Medidas de prevenção e controle são essenciais para o controle desta enfermidade nos rebanhos bubalinos.

Palavras-chave: búfalos; *Mycoplasma* spp.; micoplasmas hemotrópicos; PCR.

ASPECTS OF HEMOPLASMOSIS IN BUFFALOES - LITERATURE REVIEW

ABSTRACT: Buffalo are rustic animals that can be exploited for meat or milk production. These animals are susceptible to diseases that also affect other species of ruminants, especially cattle. However, it is believed that buffalo are more resistant to some diseases, but there are still few epidemiological studies covering infectious diseases such as hemoplasmosis in buffaloes. Hemoplasmosis is caused by hemotropic mycoplasmas or hemoplasmas, which are gram-negative bacteria that cause hemolytic anemia in immunocompromised hosts. *Mycoplasma wenyonii* and '*Candidatus*

Mycoplasma haemobos' are the main hemoplasma species that can infect buffaloes. Transmission of the disease occurs mainly via hematophagous arthropod vectors or iatrogenically. The diagnosis of infected animals is made by Polymerase Chain Reaction (PCR). Prevention and control measures are essential for the control of this disease in buffalo herds.

Keywords: buffaloes; *Mycoplasma* spp.; hemotropic mycoplasmas; PCR.

ASPECTOS DE LA HEMOPLASMOSIS EN BÚFALOS - REVISIÓN DE LA LITERATURA

RESUMEN: Los búfalos son animales rústicos que pueden ser explotados para la producción de carne o leche. Estos animales son susceptibles de contraer enfermedades que también afectan a otras especies de rumiantes, especialmente al ganado vacuno. Sin embargo, se cree que los búfalos son más resistentes a algunas enfermedades, pero todavía hay pocos estudios epidemiológicos sobre enfermedades infecciosas como la hemoplasmosis en búfalos. La hemoplasmosis está causada por micoplasmas hemotrópicos o hemoplasmas, que son bacterias gramnegativas que causan anemia hemolítica en huéspedes inmunodeprimidos. *Mycoplasma wenyonii* y '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' son las principales especies de hemoplasma que pueden infectar a los búfalos. La transmisión de la enfermedad se produce principalmente a través de vectores artrópodos hematófagos o de forma iatrogénica. El diagnóstico de los animales infectados se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las medidas de prevención y control son esenciales para controlar esta enfermedad en los rebaños de búfalos.

Palabras clave: búfalos; *Mycoplasma* spp.; micoplasmas hemotrópicos; PCR.

2.1 INTRODUÇÃO

Os búfalos são considerados animais rústicos, utilizados para a produção de carne ou leite, que podem ser criados extensivamente de forma sustentável em locais pouco propícios para outras atividades pecuárias, como áreas alagadas (DAMÉ, 2019). Diversos aspectos sobre a susceptibilidade dos bubalinos às doenças infecciosas, como a hemoplasmose, ainda são desconhecidos.

A hemoplasmose é causada por pequenas bactérias incultiváveis, gram-negativas e pleomórficas, denominadas de micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) (MESSICK, 2004; NEYMARK et al., 2001). Por serem parasitas da superfície dos eritrócitos podem causar deformidades e danos à célula e consequentemente levando à anemia hemolítica em hospedeiros susceptíveis (MELI et al., 2010; HOELZLE; HOFMANN-LEHMANN; HOELZLE, 2010). A infecção por hemoplasmas pode variar desde casos assintomáticos com persistência da bactéria no hospedeiro (MELI et al., 2010) até casos de anemia severa em espécies imunocomprometidas (SYKES et al., 2010).

Os Hemoplasmas foram reportados afetando animais de produção e de companhia no mundo todo (SYKES et al., 2010; WANG et al., 2017). Apesar da maioria dos hemoplasmas possuir hospedeiros específicos (PITCHER; NICHOLAS, 2005) seu potencial zoonótico foi demonstrado por diversos relatos, incluindo pacientes imunocomprometidos (SYKES et al., 2010; YUAN et al., 2009; MAGGI et al., 2013), mas principalmente em indivíduos superexpostos (SANTOS et al., 2008), demonstrando seu potencial de causar prejuízos e preocupações a pecuária e saúde pública (WANG et al., 2017).

Pouco se sabe sobre a susceptibilidade dos bubalinos a várias doenças infecciosas, dentre elas a hemoplasmose. Por este motivo, o objetivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica da sobre a infecção dos bubalinos por micoplasmas hemotrópicos.

2.2 ASPECTOS DA HEMOPLASMOSE EM BÚFALOS

Originalmente os micoplasmas hemotrópicos eram classificados como *Haemobartonella* e *Eperythrozoon coccoides* e pertenciam a ordem *Rickettsiales* e família *Anaplasmataceae*, devido às características fenotípicas, biológicas e o fato da transmissão ocorrer através de vetores artrópodes. Entretanto, foram reclassificados para a classe *Mollicutes*, família *Mycoplasmataceae*, gênero *Mycoplasma* spp., baseado em análises filogenéticas das sequências do gene 16S rRNA e características morfológicas, como ausência de parasitismo intracelular, parede celular e flagelo, assim como resistência à penicilina e susceptibilidade às tetraciclinas (NEYMARK et al., 2001). Além disso, por apresentarem similaridade com os micoplasmas causadores de pneumonias (MESSICK, 2004).

As mesmas espécies de hemoplasmas que acometem bovinos já foram identificadas parasitando também búfalos: *Mycoplasma wenyonii* (*M. wenyonii*) e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ (‘*Ca. M. haemobos*’) (SU et al., 2010; SANTOS et al., 2018; TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008). Ambas as espécies causam anemia hemolítica nestes ruminantes (FUJIHARA et al., 2011). Os dados da prevalência de infecção de búfalos por micoplasmas hemotrópicos ainda são relativamente escassos. A prevalência varia entre 15,4% em Moçambique (GONÇALVES et al., 2018) e 91,4% no Iraque (SAHEY; HUSSEIN; ALSAAD, 2016), conforme consta na tabela 1. No Brasil há apenas um trabalho que pesquisou a prevalência da hemoplasmosse em búfalos (SANTOS et al., 2018).

TABELA 1 – PREVALÊNCIA DE HEMOPLASMOSE EM BUBALINOS EM DIVERSOS PAÍSES DE ACORDO COM TRABALHOS ENCONTRADOS NA LITERATURA.

País	Prevalência total	<i>M. wenyonii</i>	‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> ’	Autores
Cuba	-	69,2%	38,5	Díaz-Sánchez et al. (2019)
Filipinas	80%	80%	-	Ybañes et al. (2019)
Filipinas	26,32%	-	-	Galon et al. (2020)
Moçambique	15,4%	-	-	Gonçalves et al. (2018)
Hungria	-	91,2%	73,3%	Hornok et al. (2018)
Iraque	91,4%	91,4%	-	Sahey; Hussein, Alsaad (2016)
China	32%	-	32%	Su et al. (2010)
Brasil	34,8%	15,8%	5,9%	Santos et al. (2018)

FONTE: O autor (2022).

(-) Representa dados que não foram informados no respectivo trabalho.

2.2.1 Patogenia

Os hemoplasmas se encontram aderidos aos eritrócitos, mas também podem ser encontrados livres no plasma sanguíneo de bubalinos e bovinos e ocasionalmente podem ser observados parasitando plaquetas. É possível encontrar mais de um microrganismo parasitando cada eritrócito (NEYMARK et al., 2001).

A infecção por hemoplasmas geralmente é assintomática em animais imunocompetentes até que ocorra um quadro de imunossupressão, como a ocorrência de uma doença concomitante, gestação, estresse por deficiência nutricional, esplenectomia ou coinfeções (MESSICK, 2004; SANTOS et al., 2020; SHARIFIYAZDI; HASIRI; AMINI, 2014; KONEVAL et al., 2017). Este último fator possui grande importância para os bovinos e bubalinos, devido as infecções associadas com *Anaplasma* sp., *Babesia* sp. ou *Theileria* sp., que podem levar ao agravamento da anemia hemolítica e piorar o quadro clínico do animal (NEYMARK et al., 2001; HOFMANN-LEHMANN et al., 2004; TAGAWA et al., 2013). Nestes casos, o efeito de um patógeno no organismo pode ser mascarado pelo efeito de outro patógeno, sendo difícil avaliar o potencial patogênico dos hemoplasmas (MELI et al., 2010; YBAÑEZ et al., 2019).

Não há muitas informações disponíveis sobre a patogenicidade dos hemoplasmas em bovinos (TAGAWA et al., 2010), assim como nas infecções em bubalinos. Em infecções experimentais, observou-se que ocorre um período pré-patente com duração de uma a três semanas, seguido de um período de aumento na parasitemia que pode durar de cinco a 10 dias e após este período o microrganismo se torna menos frequente no sangue, tornando a infecção crônica (GENOVA et al., 2011).

Sabe-se que a parede celular da bactéria foi perdida durante o seu processo evolutivo (MESSICK, 2004). Desta maneira, os hemoplasmas são envoltos apenas por uma membrana que confere a capacidade de se aderir à superfície dos eritrócitos, entretanto sem a capacidade de invadir a célula (FARD et al., 2014). Em suínos foi proposto que a proteína MSG1, localizada na membrana do *M. suis*, está envolvida na adesão do patógeno aos eritrócitos (HOELZLE et al., 2007). Em ovinos, a infecção com *M. ovis* demonstrou causar

fragilidade nos eritrócitos de animais infectados comparados a animais negativos após diagnóstico por PCR (HAMPEL et al., 2014).

Diversas estratégias estão envolvidas na sobrevivência dos hemoplasmas e possivelmente estão associadas a espécies específicas (MESSICK, 2004). O *M. haemofelis* possui uma enzima denominada peroxidase dismutase, que o protege de danos causados por oxidantes (BERENT; MESSICK, 2003). Já no *M. suis* identificou-se uma enzima denominada O-sialoglicoproteína do peptidase, que está relacionada à lise de eritrócitos (GUIMARAES et al., 2011).

Diferente das outras espécies do gênero *Mycoplasma* spp., os hemoplasmas dependem do hospedeiro para sobreviver a partir dos seus aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e vitaminas. Desta forma, os micoplasmas hemotrópicos não sobrevivem em meios de cultivo, pois não possuem habilidade de multiplicar o complexo nutricional provido pelo hospedeiro (MESSICK, 2004).

2.2.2 Transmissão

O ciclo de transmissão dos hemoplasmas ainda não está completamente elucidado (WITTER et al., 2017), entretanto sugere-se que os vetores artrópodes, a transmissão vertical e a iatrogênica estão envolvidas na epidemiologia da hemoplasmosse (NEYMARK et al., 2001; WILLI et al., 2007; HORNOK et al., 2010; GIROTTO-SOARES et al., 2016). No Brasil, devido ao clima favorável a presença de artrópodes hematófagos, pode-se sugerir que os animais de produção, como bovinos e bubalinos, estejam mais susceptíveis a infecção por doenças transmitidas por vetores (SANTOS et al., 2018), incluindo os hemoplasmas.

A infecção natural pode ocorrer principalmente por meio de vetores artrópodes hematófagos (WILLI et al., 2007), tais como carrapatos, piolhos, moscas e mosquitos (SANTOS et al., 2020; HORNOK et al., 2010; SONG et al., 2013; MELLO et al., 2019). Pressupõe-se que bovinos e bubalinos criados

a pasto tem maior exposição a artrópodes hematófagos que podem transmitir hemoplasmas (TAGAWA et al., 2012).

Embora a pele dos búfalos seja mais espessa que a dos bovinos (DÍAZ-SÁNCHEZ et al., 2019), a infestação destes por carrapatos é frequente e sabe-se que estes ectoparasitas conseguem completar seu ciclo em búfalos *Bubalus bubalis* (BENITEZ; CETRÁ; FLORIN-CHRISTENSEN, 2012). O principal carrapato encontrado em bubalinos no Brasil, assim como nos bovinos, é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (DAMÉ, 2019; DÍAZ-SÁNCHEZ et al., 2019; YBAÑEZ et al., 2019).

A transmissão natural de *M. wenyonii* pelos carrapatos das espécies *Dermacentor andersoni* (NEYMARK et al., 2001), *R. microplus* e *Haemaphysalis bispinosa* já foi demonstrada na Malásia (MOHD-HASAN et al., 2017). Em especial, verificou-se que na espécie *R. microplus* a transmissão transovariana e transestadial de 'Ca. *M. haemobos*' poderia ocorrer naturalmente (SHI et al., 2019a). Além disso, Shi et al. (2019b) verificaram que 48% dos carrapatos encontrados em campos/gramíneas onde ovinos infectados pastavam estavam infectados com 'Ca. *M. haemobos*'. Estas evidências sugerem que esta espécie de carrapato pode ser reservatório para esta espécie de hemoplasma.

Além dos carrapatos como vetores hematófagos, Song et al. (2013) detectaram *M. wenyonii* em piolhos, moscas e mosquitos, indicando que estes também podem servir como vetores mecânicos do agente. No entanto não se sabe se o microrganismo se propaga nestes vetores. A mosca do chifre (*Haematobia irritans*), a mosca do estábulo (*Stomoxys calcitrans*) e duas espécies de moscas de cavalos (*Tabanus bovinus* e *T. bromius*) também foram identificadas como potenciais vetores de *M. wenyonii* e 'Ca. *M. haemobos*' (HORNOK et al., 2011). Hofmann-Lehmann et al. (2004) verificaram ainda a presença destes microrganismos na mosca doméstica (*Musca domestica*) e no piolho (*Haematopinus eurysternus*). Embora não se tenha confirmação de que o piolho *Haematopinus tuberculatus*, comumente encontrado em búfalos, possa transmitir a hemoplasmosse, sugere-se que possa ser um potencial vetor do agente em ruminantes (GONÇALVES et al., 2018).

Outra forma comum de transmissão é a iatrogênica, que ocorre por meio de injeções parenterais com reutilização de agulhas e instrumentos cirúrgicos contaminados com sangue de animais infectados (NEYMARK et al., 2001), assim como por meio de transfusão sanguínea (MESSICK, 2004).

A transmissão vertical da mãe para o feto foi reportada em bovinos por meio da transmissão transplacentária, em que aparentemente os fetos podem ser infectados por hemoplasmas em qualquer estágio gestacional (SONG et al., 2013). Alsaad e colaboradores (2018) relataram que bezerros nascidos de vacas infectadas também apresentaram o patógeno no sangue. Deste modo, a transmissão transplacentária possui potencial de resultar em aborto ou nascimento de neonatos portadores de hemoplasmoses (ALSAAD et al., 2018).

Willi e colaboradores (2007) descreveram a transmissão *M. haemofelis* por meio da saliva em camundongos e gatos infectados. Deste modo, outra hipótese de transmissão que poderia ser estudada é a transmissão por mordedura de morcego, uma vez que nos últimos anos esses quirópteros vêm recebendo cada vez mais atenção como reservatórios de patógenos correlacionados às zoonoses emergentes (GONÇAVES; GALETTI; STREICKER, 2021). Análises metagenômicas demonstraram a presença de hemoplasmas na saliva de morcegos hematófagos, sugerindo a possibilidade de transmissão direta por mordeduras (VOLOKHOV et al., 2017). Ainda não há relatos de morcegos contaminados com as espécies de micoplasmas que parasitam bubalinos e bovinos, entretanto relatou-se um caso na Espanha envolvendo uma espécie de morcego insetívoro, morcego-de-peluche (*Miniopterus schreibersii*) com detecção de '*Candidatus M. haemohominis*', um hemoplasma que infecta seres humanos (SANTOS et al., 2020). Desta forma, esta possibilidade de rota de infecção é passível e interessante de ser estudada, no caso de bubalinos e bovinos.

É importante ressaltar que de acordo com estudos apresentados até o momento, a maioria das espécies de *Mycoplasma* spp., incluindo os hemoplasmas, parecem ter hospedeiros específicos (PITCHER; NICHOLAS, 2005). Esta observação parece ser resultante da interação entre hospedeiro e patógeno durante a sua evolução. Contudo, já foram relatados casos de

zoonoses e transmissão interespécies (SYKES et al., 2010; SANTOS et al., 2008; KALANTARI et al., 2020).

2.2.3 Sinais clínicos

A infecção por micoplasmas hemotrópicos geralmente é crônica, cursa de forma subclínica (SHARIFIYAZDI; HASIRI; AMINI, 2014) e raramente é fulminante em hospedeiros saudáveis (MESSICK, 2004). A bactéria pode permanecer por anos de forma assintomática no hospedeiro (NEYMARK et al., 2001). A gravidade clínica e duração da anemia variam entre os hospedeiros e pode durar de um a dois meses ou mais (SAHEY; HUSSEIN; ALSAAD, 2016). O quadro clínico causado pela hemoplasmose nos mamíferos é inespecífico e cursa com anemia, fraqueza, apatia e morte, principalmente em animais imunossuprimidos (FARD et al., 2014).

Os sinais clínicos apresentados por bubalinos com hemoplasmose ainda são pouco conhecidos (SANTOS et al., 2018). Sahey, Hussein e Alsaad (2016) relatam em seu trabalho que os búfalos infectados por *M. wenyonii* demonstraram sinais clínicos como dispneia e taquipneia, mucosas pálidas e anemia, aumento do tempo de preenchimento capilar (TPC), aumento de volume dos linfonodos superficiais, hipertermia, taquicardia e taquipneia.

Em bovinos o quadro clínico agudo ou sintomático da hemoplasmose é semelhante, mas pode incluir também anorexia, desidratação, perda de peso, queda na produção de leite, infertilidade, edema e pelame opaco e áspero (SU et al., 2010; FUJIHARA et al., 2011; TAGAWA et al., 2013; FARD et al., 2014; WITTER et al., 2017; WILLI et al., 2007; HOELZLE et al., 2011). Em bovinos leiteiros o quadro clínico pode cursar com edema de tetos e porções distais dos membros pélvicos (SMITH et al., 1990). Montes e colaboradores (1994) reportaram a infecção crônica em um touro da raça Charolês, que apresentou edema escrotal e nos membros posteriores, mas com presença muito baixa de parasitos no esfregaço de sangue periférico.

No entanto, Díaz-Sánchez e colaboradores (2019) relatam que os búfalos testados em seu estudo não apresentaram sinais clínicos, embora a

prevalência de hemoplasmose nos bubalinos testados no estudo em Cuba foi 69,2% dos animais infectados por *M. wenyonii* e 38,5% infectados por 'Ca. *M. hameobos*'. Isto pode ocorrer assim como nos bovinos, pois quando o quadro da doença é crônico, geralmente assintomático, onde os sinais clínicos surgem apenas em caso de imunossupressão (MESSICK, 2004; TAGAWA et al., 2013; SMITH et al., 1990).

A anemia e consequentemente presença de mucosas pálidas pode ocorrer pela diminuição na concentração das células vermelhas do sangue e pela eliminação dos eritrócitos parasitados pelas bactérias pelo sistema mononuclear fagocitário (SAHEY; HUSSEIN; ALSAAD, 2016; TAGAWA et al., 2010). Causas de anemia podem ser consideradas como diagnóstico diferencial para hemoplasmose. Outras doenças parasitárias que causam anemia hemolítica como a anaplasmosse, babesiose e leptospirose também podem ser consideradas potencialmente no diagnóstico diferencial (GLADDEN et al., 2016).

A icterícia ocorre pelo aumento da bilirrubina circulante no sangue em consequência à anemia hemolítica (SAHEY; HUSSEIN; ALSAAD, 2016). O aumento de temperatura corporal, taquicardia e taquipneia refletem a fase aguda da doença (FARD et al., 2014). A dificuldade respiratória e taquipneia podem ser reflexo da hipóxia causada pela anemia, uma vez que a diminuição da contagem de eritrócitos e da concentração de hemoglobina afeta a oxigenação eficiente dos tecidos corporais (HAMPEL et al., 2014). O aumento do TPC ocorre em decorrência de problemas tais como a desidratação, anemia, choque, doenças perivasculares e hipotermia, uma vez que o teste reflete a quantidade de sangue que chega aos tecidos (HOELZLE et al., 2011).

O potencial abortivo da infecção por hemoplasmose em bovinos ainda não foi esclarecido (SONG et al., 2013). Entretanto, infecções subclínicas com hemoplasmas foram associadas com diminuição da eficiência reprodutiva em suínos, incluindo atraso no estro, morte embrionária precoce e abortamentos no terço final da gestação (WU et al., 2006). Em bovinos não há relatos de abortamentos causados por hemoplasmose, mas observou-se que bezerros nascidos de mães infectadas nascem infectados e com peso significativamente

menor que bezerros nascidos de vacas sadias (TAGAWA et al., 2013; ALSAAD et al., 2018). Os bezerros nascidos infectados com *M. wenyonii* se apresentavam ofegantes, em decúbito lateral sem capacidade de se manter em posição quadrupedal, com presença de hemorragias petequiais na esclera e membranas conjuntivais, mucosas pálidas ou ictéricas, manchas de hemorragias na pele, aumento de tamanho nos linfonodos superficiais e hemoglobínúria em alguns casos. Além disso, durante o exame físico destes bezerros eles ainda se demonstraram febris, taquicárdicos e taquipneicos e com aumento significativo no TPC quando comparado com bezerros saudáveis (ALSAAD et al., 2018).

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da hemoplasmosse pode ser realizado pela Reação em Cadeira da Polimerase (PCR), pois esta técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade, mesmo em situações onde o patógeno está presente em pequenas concentrações, como ocorre nos quadros crônicos (WANG et al., 2009; WATANABE et al., 2008). O gene 16S rDNA é amplamente utilizado como alvo, pois permite a detecção e identificação de diferentes espécies de hemoplasmas (MESSICK, 2004; DÍAZ-SÁNCHEZ et al., 2019).

Outro método diagnóstico tradicionalmente utilizado é o esfregaço sanguíneo, onde os hemoplasmas podem ser visualizados na superfície de eritrócitos (MESSICK, 2004). Neste método se utiliza a coloração Romanowsky, no qual a bactéria é observada em formato circular, bastão ou cocos (FARD et al., 2014). A bactéria gram-negativa pode ser encontrada parasitando a superfície de eritrócitos individualmente, em pares ou em cadeias e pode raramente ser encontrada no plasma (MESSICK, 2004). Entretanto o método de diagnóstico por esfregaço possui baixa sensibilidade e especificidade, pois o organismo é facilmente confundido com os corpúsculos de Howell-Jolly, debris ou artefatos celulares. Além disso, em casos de infecção crônica por hemoplasmas a carga bacteriana é muito baixa, sendo quase impossível a detecção pelo esfregaço sanguíneo (RITZMANN et al., 2009).

2.2.5 Tratamento

O tratamento para hemoplasmoses é controverso, mas quando necessário, é indicado o uso das tetraciclinas, macrolídeos ou fluoroquinolonas (FARD et al., 2014; STRUGNELL; McAULIFFE, 2012). Antibióticos que agem sobre a parede celular bacteriana, como as penicilinas e cefalosporinas, são ineficazes no tratamento de hemoplasmoses, uma vez que os micoplasmas hemotrópicos não possuem parede celular (STRUGNELL; McAULIFFE, 2012). A utilização de tetraciclinas foi reportada em bovinos com relatos de melhora dos sinais clínicos em curto prazo, mas é improvável que o tratamento encurte a duração da doença (GENOVA et al., 2011; MONTES et al., 1994). Em bovinos há relato de tratamentos com melhora de quadro clínico utilizando a oxitetraciclina por três dias (10 mg/kg PV (miligrama por quilograma de peso vivo) intramuscular (IM), Engemycin® 10%) em animal coinfectado por *M. wenyonii* e 'Ca. M. haemobos' (BAGGENSTONS et al., 2012). Outro relato utilizando o mesmo fármaco descreve melhora clínica de uma vaca nas primeiras duas semanas pós-tratamento, e depois piora do quadro novamente, optou-se pela eutanásia do animal (GLADDEN et al., 2016). Genova e colaboradores (2011) descrevem um caso de uma vaca da raça Aberdeen Angus com sinais clínicos de hemoplasmoses e pneumonia, no qual utilizaram tratamento com oxitetraciclina (20 mg/kg PV, via subcutânea, por três dias) associado com flunixin meglumine (1,1 mg/kg intravenoso) como antipirético e anti-inflamatório, uma vez que o animal apresentava edema de membros pélvicos.

Em trabalho realizado por Yan e colaboradores (2008) relataram que o uso de dipropionato de imidocarb (1 mg/kg) diluído em 6,5 mL de solução fisiológica salina injetada em diversos pontos de acupuntura em vacas contaminadas com *M. wenyonii* foi efetivo, assim como a injeção de dipropionato de imidocarb (3mg/kg) IM.

Messick (2004) afirmou ainda que animais infectados com hemoplasmas mesmo que tratados com antibióticos podem permanecer portadores da doença crônica após o quadro agudo. Isso ocorre, pois o antibiótico, principalmente do grupo das tetraciclinas, pode suprimir o microrganismo, mas

não eliminá-lo completamente (BERENT; MESSICK, 2003). Terapias de suporte podem ser necessárias, como a transfusão sanguínea em casos de anemia severa (FARD et al., 2014).

2.3 CONCLUSÃO

Conclui-se que bubalinos também podem ser acometidos pela hemoplasmose, e até o presente momento, os relatos indicam que podem ser infectados pelos mesmos agentes que infectam bovinos: *M. wenyonii* e 'Ca. M. haemobos'. Embora na maioria das vezes os animais infectados sejam assintomáticos, o quadro clínico agudo da enfermidade em bubalinos é semelhante ao de bovinos. Para evitar a disseminação da enfermidade nos rebanhos bubalinos deve-se focar nas medidas de prevenção da doença, principalmente no controle de ectoparasitas e de transmissão iatrogênica.

REFERÊNCIAS

ALSAAD, K.M. et al. Acute Hemotropic Mycoplasmosis Of Newborn Calves In Basrah, Iraq. **J. Agric. Vet. Sci.** v.11, n.4, p. 28-33, 2018. doi: 10.9790/2380-1104012833

BAGGENSTOS, R. et al. Hämoplasmeninfektion bei einer Milchkuh. **Tierärztl Prax.** v.40, p.397–400, 2012. Doi: 10.5167/uzh-69252

BENITEZ, D.; CETRÁ, B.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* Ticks can Complete their Life Cycle on the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). **J. Buff. Sci.** v.1, p. 193-197, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.6000/1927-520X.2012.01.02.11>

BERENT, L.M.; MESSICK, J.B. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonellafelis*). **Infect. Immun.** v.71, p. 3657-62, 2003. doi: [10.1128/IAI.71.6.3657-3662.2003](https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3657-3662.2003)

DAMÉ, M.C.F. Sanidade de Bubalinos no Extremo Sul do Brasil. **EMBRAPA**. Fev. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1107454/sanidade-de-bubalinos-no-extremo-sul-do-brasil> Acesso em: junho 2020.

DÍAZ-SÁNCHEZ, A.A. et al. First molecular evidence of bovine hemoplasma species (*Mycoplasma* spp.) in water buffalo and dairy cattle herds in Cuba. **Parasites & Vectors.** v.12, n.78, p. 1-9, 2019. Doi: 10.1186/s13071-019-3325-y

FARD, R.M.N. et al. Haemotropic Mycoplasmas (Haemoplasmas): A Review. **Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.** v.2, p. 1484–1503, 2014. Disponível em: http://www.ijabbr.com/article_7347.html

FUJIHARA, Y. et al. Prevalence of Hemoplasma Infection among Cattle in the Western Part of Japan. **J. Vet. Med. Sci.** v.73, p. 1653–55, 2011. Doi: [10.1292/jvms.11-0269](https://doi.org/10.1292/jvms.11-0269)

GALON, E.M.S. et al. Molecular survey of tick-borne pathogens infecting backyard cattle and water buffaloes in Quezon province, Philippines. **J. Vet. Med. Sci.** v.82, n.7, p. 886–90, 2020. doi: 10.1292/jvms.19-0636

GENOVA, S.G. et al. Severe anemia associated with *Mycoplasma wenyonii* infection in a mature cow. **Can. Vet. J.** v.52, p. 1018–21, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3157061/> Acesso em: 23 set 2020.

GIROTTI-SOARES, A. et al. 'Candidatus Mycoplasma haemobos': Transplacental transmission in dairy cows (*Bos taurus*). **Vet. Microb.** p.1-11, 2016. Doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.020

GLADDEN, N. et al. A case report of *Mycoplasma wenyonii* associated immune-mediated haemolytic anaemia in a dairy cow. **Irish Vet. J.** v. 69, n.1, p. 1-8, 2016. Doi: 10.1186/s13620-016-0061-x

GONÇALVES, L.R. et al. Molecular detection of Bartonella species and haemoplasmas in wild African buffalo (*Syncerus caffer*) in Mozambique, Africa. **Parasit. Open.** v.4, n.15, p. 1–8, 2018. <https://doi.org/10.1017/pao.2018.10>

GONÇALVES, F.; GALETTI, M.; STREICKER, D.G. Periodic monitoring of vampire bats and rabies: a new framework for animal restoration projects in the Neotropics. **Perspec. Ecol. Conserv.** v.19, p.37-42, 2021. Doi:[10.32942/osf.io/53hda](https://doi.org/10.32942/osf.io/53hda)

GUIMARAES, A.M.S. et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaption to an erythrocyte niche. **PLoS One.** v.6, n. 5, p. e19574, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0019574

HAMPEL, J.A. et al. Prevalence and diagnosis of hemotrophic mycoplasma infection in research sheep and its effects on hematology variables and erythrocyte membrane fragility. **Comp. Med.** v.64, p. 478–85, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4275084/> Acesso em: nov 2020

HOELZLE, L.E. et al. MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. **Microbes. Infect.** v.9, p.466–74, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.004>

HOELZLE, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; HOELZLE, L.E. 'Candidatus Mycoplasma haemobos', a new bovine haemotrophic Mycoplasma species? **Vet. Microb.** v.144, p.525–26, 2010. Doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.023

HOELZLE, K. et al. Detection of Candidatus Mycoplasma haemobos in cattle with anaemia. **The Vet. J.** v.187, p.408–10, 2011. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.01.016

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Concurrent Infections with Vector-Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in a Cattle Herd in Switzerland. **J. Clin. Microb.** v.42, n.8, p. 3775–3780, 2004. Doi: 10.1128/JCM.42.8.3775–3780.2004

HORNOK, S. et al. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. **Vet. Microb.** v.140, p. 98–104, 2010. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.013

HORNOK, S. et al. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Vet. Microbiol.** v.152, p. 411–14, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.031>.

HORNOK, S. et al. Tick- and fly-borne bacteria in ungulates: the prevalence of Anaplasma phagocytophilum, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo and deer species in Central Europe, Hungary. **BMC Vet. Res.** v.14, n.98, p. 1-7, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1403-6>

KONEVAL, M. et al. Neglected intravascular pathogens, Babesia vulpes and haemotropic Mycoplasma spp.in European red fox (Vulpes vulpes) population. **Vet. Parasit.** v.243, p. 176-182, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.029>

KALANTARI, M. et al. The occurrence of hemotropic Mycoplasma ovis-like species in horses. **Prev. Vet. Med.** v. 175, p. 1-6, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104877>

MAGGI, R.G. et al. Infection with hemotropic Mycoplasma species in patients with or without extensive arthropod or animal contact. **J. Clin. Microbiol.** v.51, p. 3237–41, 2013. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.01125-13>

MELI, M.L. et al. Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections. **J. Clin. Microbiol.** v. 48, n. 10, p. 3563–68, 2010. doi:10.1128/JCM.02224-09

MELLO, V.V.C. et al. Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis in South America. **Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.** v.66, p. 1-10, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101337>

MESSICK, J.B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Vet. Clin. Pathol.** v. 33, p. 2–13, 2004. DOI: [10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x)

MOHD-HASAN, L.I. et al. Molecular evidence of hemoplasmas in Malaysian cattle and ticks. **Trop. Biomed.** v.34, n.3, p. 668-674, 2017. Disponível em: <https://msptm.org/files/Vol34No3/668-674-Tay-ST.pdf>

MONTES, A.J. et al. Infertility associated with Eperythrozoon wenyonii infection in a bull. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 204, p. 261-263, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8144388/>

NEIMARK, H. et al. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p. 891–899, 2001. doi: 10.1099/00207713-51-3-891

PITCHER, D.; NICHOLAS, R. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? **Vet. J.** v.170, p. 300–306, 2005. doi:10.1016/j.tvjl.2004.08.011

RITZMANN, M. et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. **Vet. Microbiol.** v.133, p.84–91, 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2008.06.015

SAHEY, D.R.; HUSSEIN, H.A.; ALSAAD, K.M. *Mycoplasma wenyonii* infection in Buffaloes of Basrah governorate Basrah ,Iraq (Clinical, hematological and diagnostic studies). In: **17 Sci. Cong. Fac. Vet. Med. Assiut Egypt.** Assiut, Egypt; p. 1-8, 2016.

SANTOS, A.P. et al. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** v.14, n.12, p. 1922–1924, 2008. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080964>.

SANTOS, N.J.R. et al. Hemotropic mycoplasmas infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from northeastern Brazil. **Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.** v.56, p. 27-29, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.12.003>

SANTOS, L.C. et al. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in free-ranging bats from Southern Brazil. **Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.** v. 69, p. 1-6, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101416>

SHARIFIYAZDI, H.; HASIRI, M.A.; AMINI, A.H. Intravascular hemolysis associated with *Candidatus Mycoplasma hematoparvum* in a nonsplenectomized dog in the south region of Iran. **Vet. Res. Forum.** v.5, n.3, p. 243-246, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279639/> Acesso em jul 2020.

SHI, H. et al. Rhipicephalus (Boophilus) microplus ticks as reservoir and vector of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in China. **Vet. Parasit.** v.274, p. 1-5, 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108929>

SHI, H. et al. Molecular investigation of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in goats and sheep in central China, **Transbound. Emerg. Dis.** v.66, p. 22–27, 2019b. Doi: 10.1111/tbed.13021

SMITH, J.A. et al. Eperythrozoon wenyonii infection in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.196, n.8, p. 1244- 50, 1990. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19902206665> Acesso em: jul 2020

- SONG, Q. et al. Detection of *Mycoplasma wenyonii* in cattle and transmission vectors by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **Trop. Anim. Health Prod.** v.45, p.247–250, 2013. Doi: 10.1007/s11250-012-0197-y
- STRUGNELL, B.; McAULIFFE, L. *Mycoplasma wenyonii* infection in cattle. **In Pract.** v.34, p. 146–154, 2012. doi:10.1136/inp.e1550
- SU, Q.L. et al. The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China . **Trop. Anim. Health Prod.** v.42, p. 1805–08, 2010. Doi: 10.1007/s11250-010-9640-0
- SYKES, J.E. et al. Human coinfection with *Bartonella henselae* and Two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. **J. Clin. Microb.** v.48, n.10, p. 3782–85, 2010. Doi:10.1128/JCM.01029-10
- TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle in Hokkaido, Japan. **Vet. Microbiol.** v.132, p. 177–180, 2008. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.006
- TAGAWA, M. et al. Comparison of the Effect of Two Hemoplasma Species on Hematological Parameters in Cattle. **J. Vet. Med. Sci.** v.72, n.1, p. 113–115, 2010. Doi: [10.1292/jvms.09-0304](https://doi.org/10.1292/jvms.09-0304)
- TAGAWA, M. et al. Prevalence and Risk Factor Analysis of Bovine Hemoplasma Infection by Direct PCR in Eastern Hokkaido, Japan. **J. Vet. Med. Sci.** v.74, n. 9, p. 1171–76, 2012. doi: 10.1292/jvms.12-0118
- TAGAWA, M. et al. Effect of chronic hemoplasma infection on cattle productivity. **J. Vet. Med. Sci.** v.75, n.10, p. 1271-75, 2013. doi: 10.1292/jvms.13-0119.
- VOLOKHOV, D.V. et al. Novel hemotropic mycoplasmas are widespread and genetically diverse in vampire bats. **Epidemiol. Infect.** v.145, p. 3154–67, 2017. <https://doi.org/10.1017/S095026881700231X>
- WANG, J. et al. Detection of *Eperythrozoon wenyonii* by PCR assay. **Front. Agri. China.** v.3, n.1, p. 100-103, 2009. Doi: [10.1007/s11703-009-0014-1](https://doi.org/10.1007/s11703-009-0014-1)

WANG, X. Molecular characterization of hemotropic mycoplasmas (*Mycoplasma ovis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemovis*') in sheep and goats in China. **BMC Vet. Res.** v.13, n.142, p. 1-8, 2017. Doi: 10.1186/s12917-017-1062-z

WATANABE, M. et al. Molecular detection of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' Infection in cats by direct PCR using whole blood without DNA extraction. **J. Vet. Med. Sci.** v.70, p. 1095–99, 2008. doi: 10.1292/jvms.70.1095

WILLI, B. et al. From Haemobartonella to hemoplasma: Molecular methods provide new insights, **Vet. Microbiol.** v.125, p. 197–209, 2007. doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.027

WITTER, R. et al. Prevalence of Candidatus *Mycoplasma haemobos* detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil. **Ciência Rural.** v.47, n.3, p. 1-6, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160805>.

WU, J. et al. Porcine eperythrozoonosis in China. **Ann NY Acad Sci.** v.1081, p. 280-285, 2006. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.038>

YAN, Z. et al. Treatment of *Mycoplasma wenyonii* Infection in Cows with Imidocarb Dipropionate Injection-acupuncture. **J. Acupunct. Meridian Stud.** v.1, n.2, p. 143–148, 2008. Doi: [10.1016/S2005-2901\(09\)60035-2](https://doi.org/10.1016/S2005-2901(09)60035-2)

YBAÑEZ, A.P. et al. First molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and the ectoparasite biodiversity in dairy water buffalo and cattle in Bohol, Philippines. **Parasit. intern.** v.70, p. 77-81, 2019. doi:10.1016/j.parint.2017.11.009

YUAN, C.L. et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **Am. J. Vet. Res.** v.70, p.890-894, 2009. doi:<https://doi.org/10.2460/ajvr.70.7.890>.

3 CAPÍTULO 2: DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPLASMAS EM BÚFALOS NO ESTADO DO PARANÁ

RESUMO: Hemoplasmas são pequenas bactérias gram-negativas, sem parede celular, oportunistas que podem ser encontradas ligadas a superfície de eritrócitos e podem levar à anemia em hospedeiros susceptíveis. A infecção por *M. wenyonii* pode levar a linfadenopatia, diarreia, queda na produção de leite, infertilidade, edema de tetos, perda de peso e ineficiência reprodutiva. Amostras de sangue de 138 bubalinos provenientes de seis municípios do estado do Paraná, oriundos de 10 rebanhos, foram coletadas por meio de venopunção e armazenadas em tubos com anticoagulante EDTA. DNA foi extraído do sangue utilizando kit comercial (Illustra, GE Healthcare, UK). Amostras foram avaliadas para hemoplasmas por meio do qPCR utilizando primers destinados ao gene 16S rDNA utilizando SYBR™green PCR mix (Promega, Madison, WI, USA). Algumas amostras positivas que demonstraram variação na temperatura de dissociação na PCR em tempo real (76.7°C, 77.1°C e 78.4°C) foram submetidas ao PCR convencional utilizando um protocolo pan-hemoplasma com os primers 16S rDNA gene (~1000bp). Os amplicons foram visualizados em gel agarose 1,5% e purificados utilizando grânulos magnéticos (SpeedBead Magnetic Carboxylate Modified Particles, Azide 0.05 %), e sequenciados em ambas as direções pelo método Sanger. As sequências foram analisadas utilizando Geneious 8.1.9 (Biomatters, Auckland, New Zealand), e as sequências foram comparadas às bases de dados de nucleotídeos GenBank® utilizando BLAST®. Um total de 127/138 (92,02%) das amostras de sangue foram positivas pelo pan-hemoplasma qPCR. O sequenciamento do 16S rDNA de quatro amostras positivas demonstrou três ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ e um *Mycoplasma wenyonii* isolados 100% idênticos à ‘*Ca. M. haemobos*’ (MG948633.1, MG948632.1, MG948631.1) e *M. wenyonii* (MG948626.1). A prevalência de búfalos infectados por hemoplasmas no estado do Paraná foi alta. Este é o segundo estudo a determinar a frequência de búfalos com hemoplasmosse no Brasil.

Palavras-chave: bubalinos; hemoplasma; *Mycoplasma* spp.; sangue; PCR; qPCR

MOLECULAR DETECTION OF HEMOTROPIC MYCOPLASMAS IN BUFFALOES FROM PARANÁ STATE, BRAZIL

ABSTRACT: Hemoplasmas are gram-negative, small wall-less cells, opportunistic bacterias that can be found attached to the surface of erythrocytes and can cause anemia in susceptible hosts. Infection with *M. wenyonii* can lead to lymphadenopathy, diarrhea, decreased milk production, infertility, teat edema, weight loss, and reproductive inefficiency. Blood samples from 138 buffaloes from six municipalities from Paraná state, from 10 different herds, were collected by venipuncture and stored in tubes with EDTA anticoagulant. DNA was extracted from blood using a commercial kit (Illustra, GE Healthcare, UK). Samples were evaluated for hemoplasmas by qPCR using primers targeting the 16S rDNA gene using SYBRTMgreen PCR mix (Promega, Madison, WI, USA). Some positive samples that demonstrated variation in dissociation temperature on real-time PCR (76.7°C, 77.1°C, and 78.4°C) were subjected to conventional PCR using a pan-hemoplasma protocol with the 16S rDNA gene primers (~1000bp). Amplicons were visualized on 1.5% agarose gel and purified using magnetic beads (SpeedBead Magnetic Carboxylate Modified Particles, Azide 0.05 %), and sequenced in both directions by the Sanger method. Sequences were analyzed using Geneious 8.1.9 (Biomatters, Auckland, New Zealand), and sequences were compared to GenBank® nucleotide databases using BLAST®. A total of 127/138 (92.02%) of the blood samples were positive by pan-hemoplasma qPCR. Sequencing of the 16S rDNA from four positive samples demonstrated three 'Candidatus Mycoplasma haemobos' and one *Mycoplasma wenyonii* isolates 100% identical to 'Ca. M. haemobos' (MG948633.1, MG948632.1, MG948631.1) and *M. wenyonii* (MG948626.1). The prevalence of buffaloes infected by hemoplasmas in the state of Paraná was high. This is the second study to determine the frequency of buffaloes with hemoplasmosis in Brazil.

Key-words: hemoplasmosis; *Mycoplasma* spp.; blood; PCR; qPCR;

3.1 INTRODUÇÃO

Búfalos são animais rústicos que se adaptam bem em locais pouco propícios para outras atividades pecuárias, como áreas de banhados (DAMÉ, 2019). Estes vêm sendo utilizados para tração animal, produção de carne e leite (RAJÃO et al., 2010), mas apesar da importância dos búfalos para a produção de alimentos, aspectos sobre algumas doenças nestas espécies ainda são pouco elucidadas (ALBERNAZ et al., 2015).

Micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, são bactérias gram-negativas pleomórficas, não cultiváveis em meios convencionais, que causam quadros de anemia hemolítica aguda ou anemia crônica com imunossupressão em diversas espécies de mamíferos (MESSICK, 2004; NEYMARK et al., 2001; HOELZLE, 2008; NEYMARK; KOCAN, 1997). Os hemoplasmas não possuem parede celular e parasitam a superfície dos eritrócitos causando deformidades e danos à célula, levando à anemia hemolítica e icterícia (MELI et al., 2010; HOELZLE; HOFMANN-LEHMANN; HOELZLE, 2010). Esses microrganismos podem persistir por anos em latência no organismo dos animais sem causar sinais clínicos (MELI et al., 2010) e são encontradas principalmente no sangue periférico de animais (NEYMARK et al., 2001).

A transmissão de hemoplasmas nos animais ainda não é completamente elucidada (WITTER et al., 2017). A infecção pode ocorrer por meio de vetores artrópodes hematófagos (WILLI et al., 2007), tais como carrapatos, piolhos, moscas e mosquitos (HOFMANN-LEHMANN et al., 2004; HORNOK et al., 2010; MELLO et al., 2019; SONG et al., 2013). A transmissão por via iatrogênica acontece por meio de injeções parenterais com reutilização de agulhas e instrumentos cirúrgicos ou transfusão de sangue com sangue de animais contaminados em fase de latência ou evidentemente infectados (NEYMARK et al., 2001; MESSICK, 2004). A transmissão vertical da mãe para o feto foi reportada em bovinos por meio da transmissão transplacentária (GIROTTI-SOARES et al., 2016).

A hemoplasmosose é uma zoonose emergente, com potencial de causar prejuízos e preocupações à pecuária e saúde pública e foi reportada afetando animais de produção e de companhia no mundo todo, inclusive seres humanos

(WANG et al., 2017; SYKES et al., 2010). A maioria dos hemoplasmas possui hospedeiros específicos (PITCHER; NICHOLAS, 2005). Nos ruminantes há relatos de hemoplasmas infectando bovinos (WITTER et al., 2017; MOHD-HASAN et al., 2017; MELLO et al., 2019), ovinos (SOUZA et al., 2019; WANG et al., 2017), caprinos (MACHADO et al., 2017; SHI et al., 2019), Também foram identificados parasitando outros ruminantes como cervídeos (ANDRÉ et al., 2020; GRAZZIOTIN et al., 2011) e camelos (ESMAILNEJAD et al., 2019; SHARIFIYAZDI et al., 2018).

As mesmas espécies de micoplasmas hemotrópicos que acometem bovinos também já foram identificadas parasitando búfalos: *Mycoplasma wenyonii* (*M. wenyonii*) e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ (*Ca. M. haemobos*) (SU et al., 2010; SANTOS et al., 2018; TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008). A hemoplasmose em bubalinos já foi relatada em Cuba (DÍAZ-SÁNCHEZ et al., 2019), nas Filipinas (YBAÑES et al., 2019; GALON et al., 2020), Moçambique (GONÇALVES et al., 2018), Hungria (HORNOK et al., 2018), Iraque (SAHEY; HUSSEIN; ALSAAD, 2016), China (SU et al., 2010) e Brasil (SANTOS et al., 2018). Este estudo realizado no Brasil verificou que 34,8% dos bubalinos testados no Maranhão tiveram diagnóstico positivo para *Mycoplasma* sp., dentre estes 15,8% estavam infectados com *M. wenyonii*, 5,9% para ‘*Ca. M. haemobos*’ e 78,2% eram positivos para ambas as espécies. Pelo conhecimento do autor este é o único trabalho realizado no Brasil pesquisando a prevalência de hemoplasmas em búfalos.

Os casos de hemoplasmose podem variar na sua cronicidade e gravidade (SYKES et al., 2010) e geralmente cursa de forma subclínica (SHARIFIYAZDI et al., 2014). Alguns estudos relatam que os bovinos com quadro clínico agudo podem apresentar anemia, mucosas pálidas, febre transitória, debilidade, perda de apetite, anorexia, perda de peso, desidratação, queda na produção de leite, infertilidade, edema e pelame opaco e áspero quando infectados por *M. wenyonii* e/ou ‘*Ca. M. haemobos*’ (WITTER et al., 2017; HOEZLE et al., 2011; FUJIHARA et al., 2011; FARD et al., 2014; WILLI et al., 2007; TAGAWA et al., 2013; SU et al., 2010). Os sinais clínicos apresentados pelos bubalinos ainda são pouco conhecidos (SANTOS et al., 2018). No entanto, Sahey, Hussein e Alsaad (2016) relatam que os búfalos infectados por *M. wenyonii* demonstraram sinais clínicos como dispneia e taquipneia, mucosas pálidas e anemia,

aumento do TPC, aumento de volume dos linfonodos superficiais, hipertermia, taquicardia e taquipneia.

O diagnóstico mais sensível e específico para identificação de diferentes espécies de micoplasmas hemotrópicos é por meio da PCR (MELI et al., 2010). A PCR é uma técnica que amplifica um fragmento de DNA do organismo in vitro (DÍAZ-SÁNCHEZ et al., 2019), onde o gene 16S do rRNA é a base para o diagnóstico de hemoplasmose (MESSICK, 2004). A amplificação na PCR realizada diretamente de uma alíquota de sangue de animais permite a detecção direta do patógeno no sangue (WATANABE et al., 2008), mesmo o patógeno estando presente em pequenas quantidades, o que ocorre nos quadros crônicos (WANG et al., 2009).

Pouco se sabe sobre a susceptibilidade dos bubalinos à hemoplasmose no Brasil. Por este motivo, o objetivo deste trabalho é determinar a prevalência de hemoplasmose em búfalos criados no estado do Paraná.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Comitê de ética

Este projeto foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o protocolo 043/2020.

3.2.2 Área de estudo

Uma equipe envolvendo a UFPR coletou as amostras. Foram utilizados 138 bubalinos, dentre eles: machos e fêmeas, jovens e adultos. Os animais utilizados no estudo são provenientes de diferentes cidades localizadas no estado do Paraná. Dentre os municípios estão: Campo Largo (n=7), Castro (n=25), Cerro azul (n=21), Adrianópolis (n=5), Morretes (n=21), Ponta Grossa (n=6) e Rio Branco do Sul (n=53). A mesorregião e municípios, assim como o número de amostras e propriedades utilizadas por município estão ilustrados abaixo na tabela 2.

TABELA 2 – MESORREGIÃO E MUNICÍPIOS DE ONDE FORAM COLETADAS AS AMOSTRAS DE SANGUE DE BUBALINOS, NÚMERO DE PROPRIEDADES COLETADAS EM CADA MUNICÍPIO E NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS POR MUNICÍPIO.

Mesorregião	Municípios	Número de propriedades por município	Número de amostras coletadas
Centro Oriental	Castro	1	25
	Ponta Grossa	1	6
Curitiba	Adrianópolis	1	5
	Campo Largo	1	7
	Cerro Azul	2	21
	Morretes	1	21
	Rio Branco do Sul	3	53
Total	07	10	138

FONTE: O autor, 2022.

3.2.3 Amostragem

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue de cada animal por meio da venopunção jugular ou vasos coccígeos, que foram armazenados em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético sódico (EDTA-sódico) a 10%, na proporção de 1,8 mg/mL de sangue. As amostras coletadas foram separadas em alíquotas e armazenadas a -80°C para posterior para detecção de micoplasmas hemotrópicos por meio da técnica de PCR. Todos os tubos foram devidamente identificados. As amostras foram encaminhadas para realização da PCR no laboratório do Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), no campus de Botucatu-SP.

3.2.4 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com 200 µL de sangue por amostra, utilizando o kit comercial Illustra™ Blood genomic Prep Mini Spin Kit (Illustra, GE Healthcare, UK) de acordo com as instruções do fabricante. A cada ciclo de extração de amostras, um controle negativo (água livre de nucleases) foi incluído para garantir que não houvesse contaminação cruzada.

3.2.5 PCR em tempo real

Todas as amostras foram inicialmente analisadas para a presença de hemoplasmas utilizando um protocolo pan-hemoplasma com alvo para o gene

16S rDNA por meio da PCR em tempo real (qPCR) com SYBR™ Green PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) (WILLI et al., 2009).

3.2.6 PCR convencional e Sequenciamento Sanger

Foram selecionadas 34 amostras que apresentaram variação na temperatura de dissociação (T_m) e no número de ciclos para a curva de reação (C_t) na qPCR para a realização de PCR convencional para confirmar o teste. Para a PCR convencional utilizou-se um protocolo pan-hemoplasma com os *primers* 16S_HAEMOforw 5'GGCCCATATTCCT(AG)CGGGAAG3' e 16S_HAEMOrev 5'AC(AG)GGATTACTAGTGATTCCA3' (Hoelzle et al., 2011) com alvo para o gene 16S rDNA (~1000 pares de base (pb)). Os amplicons (~1000 pb) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 40 minutos a 100 Volts e posteriormente visualizados no equipamento de Luz ultravioleta UV light transilluminator (GE ImageQuant™LAS 500).

Foram selecionadas 4 amostras que apresentaram variação na temperatura de dissociação na PCR em tempo real (76,7°C, 77,1°C 78,4°C) para o sequenciamento pelo método Sanger. Os produtos da PCR convencional foram purificados utilizando 1.8x Beads Magnéticas (SpeedBead Magnetic Carboxylate Modified Particles, Azide 0.05 %, GE Healthcare UK) e submetidas ao sequenciamento em ambas as direções. As sequencias senso e anti-senso foram analisadas utilizando o Geneious 8.1.9 (Biomatters, Auckland, New Zealand) e as sequências consenso foram comparadas com as sequencias depositadas no GenBank® por meio do software BLAST® nucleotide (National Center for Biotechnology Information; Bethesda, MD, USA).

3.2.7 Análise estatística

Análise estatística foi realizada de maneira descritiva utilizando medidas de frequência.

3.3 RESULTADOS

Quando utilizado o teste de PCR tempo real para diagnóstico de hemoplasmoses, 92,02% (127/138) foram positivas para *Mycoplasma* sp. O

quadro abaixo (tabela 3) dispõe dos dados de prevalência de cada propriedade de onde as amostras de sangue de bubalinos foram coletadas.

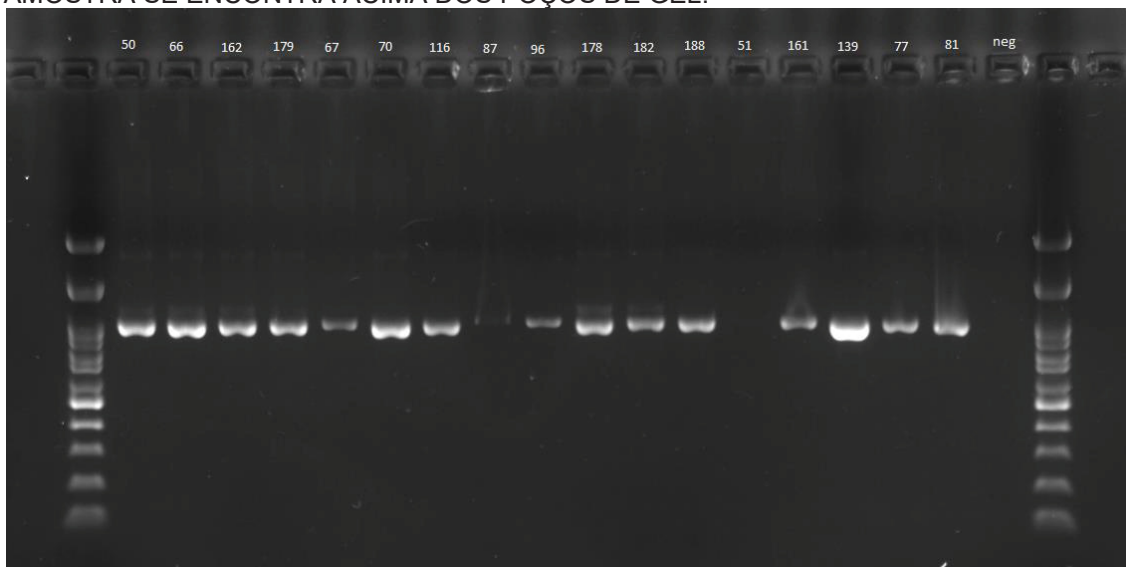
TABELA 3 – LOCALIZAÇÃO, NÚMERO DE ANIMAIS COLETADOS EM CADA PROPRIEDADE E QUANTIDADE DE ANIMAIS POSITIVOS PARA HEMOPLASMOSE POR MÉTODO DE PCR TEMPO REAL.

Propriedade	Localização	Nº de animais coletados	Positivos PCR tempo real	% positivo
1	Morretes	21	20	95,23%
2	Cerro Azul	10	10	100%
3	Cerro Azul	11	7	63,63%
4	Castro	25	24	96,0%
5	Rio Branco do Sul	5	3	60,0%
6	Rio Branco do Sul	21	20	95,23%
7	Rio Branco do Sul	27	25	92,59%
8	Campo Largo	7	7	100%
9	Adrianópolis	5	5	100%
10	Ponta Grossa	6	6	100%
Total	10	138	127	92,02%

FONTE: O autor, 2022.

Algumas amostras foram submetidas à PCR convencional, resultado demonstrado na figura 1. Observa-se que todas as amostras sequenciadas na figura 1 obtiveram presença de fragmentos, sendo positivas para micoplasmas hemotrópicos, exceto a amostra 51. As amostras 77 e 81 foram utilizadas como controle positivo. Em seguida, quatro amostras foram selecionadas para sequenciamento pelo método Sanger, onde três foram positivas para '*Ca. M. haemobos*', enquanto uma foi positiva para *M. wenyonii*. Estas amostras pertenciam a animais advindos da propriedade localizada em Castro.

FIGURA 1 – IMAGEM DE UMA DAS PLACAS DE PCR CONVENCIONAL NA LEITURA EM GEL AGAROSE SOB LUZ DE IMUNOFLUORESCÊNCIA. A IDENTIFICAÇÃO DE CADA AMOSTRA SE ENCONTRA ACIMA DOS POÇOS DE GEL.



FONTE: O autor, 2021.
(Neg: controle negativo)

3.4 DISCUSSÃO

Tanto *M. wenyonii* como '*Ca. M. haemobos*' foram detectados em búfalos provenientes do estado do Paraná. Este é o primeiro trabalho a determinar a prevalência de bubalinos infectados por hemoplasmas por meio de método molecular no sul do Brasil.

A prevalência de búfalos infectados por hemoplasmas no estado do Paraná foi mais alta que em outros trabalhos, ficando mais próximo dos resultados trazidos por Hornok e colaboradores (2018), que obtiveram 91,2% dos bubalinos testados positivos para *M. wenyonii* e 73,3% para '*Ca. M. haemobos*' na Hungria. Sahey, Hussein e Alsaad (2016) também obtiveram prevalência semelhante, de 91,4% dos búfalos positivos para *M. wenyonii* no Iraque. Ybañes e colaboradores (2020) obtiveram 80% das búfalas leiteiras positivas para o mesmo agente nas Filipinas. Deste modo, pode-se afirmar que o presente trabalho conta com a maior prevalência de hemoplasmose detectada em búfalos até o presente momento.

O único trabalho sobre a prevalência de hemoplasmose em búfalos no Brasil foi realizado por Santos e colaboradores (2018) e obteve 34,83% dos bubalinos infectados por *Mycoplasma* spp. e, dentre estes animais, 15,84% eram positivos apenas para *M. wenyonii*, enquanto 5,94% eram positivos

apenas para '*Ca. M. haemobos*' e 69,22% dos animais positivos estavam infectados por ambas as espécies. No entanto este estudo utilizou apenas bubalinos provenientes do estado do Maranhão, localizado na região nordeste do Brasil. A diferença de prevalência quando comparada à obtida no presente trabalho pode ser atribuída à diferença climática, manejos, métodos de criação ou pressão de infecção da região. Observa-se também que as duas espécies encontradas pelo PCR convencional no Maranhão também foram identificadas infectando bubalinos provenientes do estado do Paraná. Isso pode sugerir que as espécies de micoplasmas hemotrópicos que infectam bubalinos estão disseminados em território nacional.

A prevalência de hemoplasmose em bovinos no estado do Paraná foi determinada por Giroto e colaboradores (2012), que obteve 60,97% (264/433) de amostras de sangue de bovinos leiteiros positivos para '*Ca. M. haemobos*'. Entretanto neste trabalho não foi realizado o sequenciamento para identificação de *M. wenyonii*. Ainda assim, pode-se observar que a prevalência de hemoplasmose em bovinos no estado do Paraná encontrada por Giroto e colaboradores (2012) é menor que a obtida nos bubalinos no presente estudo.

A transmissão dos hemoplasmas pode ocorrer por meio de vetores artrópodes, por transmissão vertical e iatrogênica (NEYMARK et al., 2001; WILLI et al., 2007; HORNOK et al., 2010; GIROTO-SOARES et al., 2016). Pressupõe-se que bovinos e bubalinos criados a pasto podem ser mais susceptíveis à infecção através de vetores, tais como carrapatos, piolhos, moscas e mosquitos (SANTOS et al., 2020; HORNOK et al., 2010; SONG et al., 2013; MELLO et al., 2019; TAGAWA et al., 2012; MOHD-HASAN et al., 2017). Ademais, o clima no Brasil favorece o aparecimento destes vetores hematófagos em meio aos rebanhos (SANTOS et al., 2018).

Carrapatos *Rhipicephalus microplus* frequentemente parasitam búfalos *Bubalus bubalis* e sabe-se que estes ectoparasitos conseguem completar seu ciclo nestes hospedeiros (BENITEZ et al., 2012; DAMÉ, 2004; DÍAZ-SÁNCHEZ et al., 2019; YBAÑEZ et al., 2019) e a transmissão natural de *M. wenyonii* já foi identificada por meio destes vetores (MOHD-HASAN et al., 2017; SHI et al., 2019). Piolhos *Haematopinus tuberculatus* são frequentemente encontrados parasitando búfalos (GONÇALVES et al., 2018) e, embora não se tenha confirmação de que esta espécie em especial, Hofmann-Lehmann e

colaboradores (2004) verificaram a presença de hemoplasmas em piolhos *Haematopinus eurysternus* infectados de maneira natural, sugerindo que piolhos possam transmitir a hemoplasmosse também. Song e colaboradores (2013) também detectaram o DNA de hemoplasmas em piolhos, moscas e mosquitos, sugerindo que estes sejam vetores do agente.

Apesar da comum associação entre hemoplasmosse e ectoparasitas (MELLO et al., 2019; WILLI et al., 2007), um trabalho verificou que bubalinos sem a presença do carrapato *Rhipicephalus microplus*, estavam mais frequentemente parasitados com 'Ca. M. haemobos' do que búfalos onde foi constatada a presença de carrapatos (DÍAZ-SANCHEZ et al., 2019). Embora tenha sido observada a presença de carrapatos e piolhos nos bubalinos utilizados no presente estudo, estes ectoparasitos não foram coletados, quantificados ou devidamente identificados e a pesquisa de DNA de hemoplasmas nestes parasitos também não foi realizada. Outra limitação do presente estudo foi não ter acesso aos fatores de risco para a hemoplasmosse em búfalos criados no Paraná.

Todos os animais utilizados para coleta de sangue neste estudo estavam aparentemente saudáveis, apesar da alta prevalência de hemoplasmosse. Ainda assim, há trabalhos que relatam que a hemoplasmosse em bubalinos pode causar sinais clínicos como anemia e mucosas pálidas, hipertermia, anorexia, fraqueza, apatia e morte quando o animal apresenta um quadro de imunossupressão (MESSICK, 2004; SANTOS et al., 2020; SHARIFIYAZDI et al., 2014; KONEVAL et al., 2017; FARD et al., 2014; SAHEY et al., 2016). Em bovinos relata-se também a queda na produção de leite, perda de peso, desidratação, edema de tetos ou porções distais de membros e pelame de aspecto opaco e áspero (SU et al., 2010; FUJIHARA et al., 2011; TAGAWA et al., 2013; FARD et al., 2014; WITTER et al., 2017; WILLI et al., 2007; HOELZLE et al., 2011; SMITH et al., 1990). O acompanhamento ou monitoramento dos animais detectados positivos para a hemoplasmosse seria interessante para observações de possíveis sinais clínicos que pudessem ser demonstrados referentes à doença.

A prevenção e controle da hemoplasmosse ocorrem principalmente a partir de medidas como o controle de ectoparasitos no rebanho, principalmente carrapatos e piolhos, e adoção de medidas que evitem a transmissão

iatrogênica da enfermidade, tais como evitar reutilização de agulhas, seringas e instrumentos cirúrgicos que possam estar contaminados com sangue de outros animais (NEYMARK et al., 2001; SHI et al., 2019).

3.5 CONCLUSÃO

A prevalência de *Mycoplasma* spp. em bubalinos testados em diferentes propriedades e municípios no estado do Paraná é alta, sendo considerada a maior encontrada na literatura até o presente momento. Este é o primeiro trabalho a investigar a prevalência de hemoplasmas em bubalinos neste estado e o segundo no Brasil. Foram diagnosticados *M. wenyonii* e 'Ca. *M. haemobos*' nestes animais. Novos estudos são necessários para determinar as espécies de ectoparasitas que se encontram em bubalinos infectados por hemoplasmas no estado do Paraná e verificar a sua capacidade como vetores de micoplasmas hemotrópicos. A hemoplasmose por ser uma zoonose emergente é um problema de saúde pública e animal.

REFERÊNCIAS

ALBERNAZ, T.T., et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon region, Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.** 2015. DOI 10.1007/s11250-015-0884-6

ANDRÉ, M.R., et al. New records and genetic diversity of *Mycoplasma ovis* in free-ranging deer in Brazil. **Epidem. and Infection**, v.148, p.1-7, 2020.
<https://doi.org/10.1017/S0950268819002218>

BENITEZ, D.; CETRÁ, B.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* Ticks can Complete their Life Cycle on the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). **J. Buff. Sci.**, v.1, p. 193-197, 2012. DOI:
<http://dx.doi.org/10.6000/1927-520X.2012.01.02.11>

DAMÉ, M.C.F. Sanidade de Bubalinos no Extremo Sul do Brasil. **EMBRAPA**. Fev. 2019.

DÍAZ-SÁNCHEZ, A.A., et al. First molecular evidence of bovine hemoplasma species (*Mycoplasma* spp.) in water buffalo and dairy cattle herds in Cuba. **Parasites & Vectors**. v. 12, n. 78, p. 1-9, 2019.

ESMAILNEJAD, B., et al. Trypanosoma evansi and “Candidatus *Mycoplasma haemolamae*” Co-Infection in One-Humped Camel (*Camelus dromedarius*) from the Northwest of Iran: A Case Report. **Iran J. Parasitol**, v.14, n. 2, p.347-35, 2019.

FARD, M.N., et al. Haemotropic Mycoplasmas (Haemoplasmas): A Review. **Int. J. Adv. Biological and Biomedical Research**, v.2, p. 1484–1503, 2014.

FUJIHARA, Y., et al. Prevalence of Hemoplasma Infection among Cattle in the Western Part of Japan. **J. Vet. Med. Science**, v.73, p. 1653–1655, 2011.

GALON, E.M.S., et al. Molecular survey of tick-borne pathogens infecting backyard cattle and water buffaloes in Quezon province, Philippines. **J. Vet. Med. Sci.** v.82, n.7, p. 886–890, 2020. doi: 10.1292/jvms.19-0636

GIROTTTO, A. et al. Molecular detection and occurrence of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' in dairy cattle of Southern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 3, p. 342-344, jul.-set. 2012.

GIROTTTO-SOARES, A., et al. '*Candidatus Mycoplasma haemobos*': Transplacental transmission in dairy cows (*Bos taurus*). **Vet. Microbiol.**, p. 1-11, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.020>

GONÇALVES, L.R., et al. Molecular detection of Bartonella species and haemoplasmas in wild African buffalo (*Syncerus caffer*) in Mozambique, Africa. **Parasit. Open**, v.4, n.15, p.1–8, 2018. <https://doi.org/10.1017/pao.2018.10>

GRAZZIOTIN, A.L., et al. Mycoplasma ovis in captive cervids: Prevalence, molecular characterization and phylogeny. **Vet. Microbiol.**, v.152, p. 415-419, 2011. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.001

HOELZLE, L.E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in Mycoplasma suis. **Vet. Microbiol.** v.130, p.215–226, 2008.

HOELZLE, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; HOELZLE, L.E. '*Candidatus Mycoplasma haemobos*', a new bovine haemotrophic Mycoplasma species? **Vet. Microbiol.** v.144, p.525–526, 2010. DOI:10.1016/j.vetmic.2010.04.023

HOELZLE, K., et al. Detection of *Candidatus Mycoplasma haemobos* in cattle with anaemia. **Vet. J.** v.187, p. 408–410, 2011.

HOFMANN-LEHMANN, R., et al. Concurrent Infections with Vector-Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in a Cattle Herd in Switzerland. **J. Of Clin. Microbiol.**, v. 42, n.8, p. 3775–3780, ago. 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3775–3780.2004

HORNOK, S. et al. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. **Vet. Microbiol.**, v.140, p. 98–104, 2010. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.013

HORNOK, S., et al. Tick- and fly-borne bacteria in ungulates: the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo

and deer species in Central Europe, Hungary. **BMC Vet. Res.**, v.14, n.98, p.1-7, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1403-6>

KONEVAL, M., et al. Neglected intravascular pathogens, Babesia vulpes and haemotropic Mycoplasma spp.in European red fox (Vulpes vulpes) population. **Vet. Parasit.** v.243, p. 176-182, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.029>

MACHADO, C.A.L., et al. Mycoplasma ovis infection in goat farms from northeastern Brazil. **Comp. Immunol., Microbiol. and Infect. Dis.**, v.55, p. 1–5, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2017.08.004>

MELI, M.L., et al. Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections. **J. Clin. Microbiol.** v. 48, p. 3563–3568, 2010.

MELLO, V.V.C. de, et al. Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis in South America. **Comp. Immunol., Microbiol. and Infect. Dis.** v. 66, p. 1-10, 2019.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Vet. Clin. Pathol.** v.33, p. 2–13, 2004.

MOHD-HASAN, L.I., et al. Molecular evidence of hemoplasmas in Malaysian cattle and ticks. **Tropical Biomedicine.** v.34, n.3, p.668-674, 2017. Disponível em: <https://msptm.org/files/Vol34No3/668-674-Tay-ST.pdf>

NEIMARK, H.; KOCAN, K.M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*. **FEMS Microbiol. Lett.** v.156, p. 287–291, 1997.

NEIMARK, H., et al. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p. 891–899, 2001.

PITCHER, D.; NICHOLAS, R. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? **Vet. J.** v.170, p.300–306, 2005.

RAJÃO, D. de S., *et al.* Estudo da infecção pelo vírus da leucose bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no estado de Minas Gerais. **Rev. Bras. Med. Vet.** v. 32, p.42-45, 2010.

SAHEY, D.R.; HUSSEIN, H.A.; ALSAAD, K.M. *Mycoplasma wenyonii* infection in Buffaloes of Basrah governorate Basrah ,Iraq (Clinical ,hematological and diagnostic studies). **17 Sci. Cong.** Fac.Vet.Med.Assiut.Egypt, p. 1-8, 2016.

SANTOS, N.J.R., *et al.* Hemotropic mycoplasmas infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from northeastern Brazil. **Comp. Immunol., Microbiol. and Infect. Dis.** v. 56, p.27-29, 2018.

SANTOS, L.C. *et al.* Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in free-ranging bats from Southern Brazil. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v.69, p.1-6, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101416>

SHARIFIYAZDI, H., *et al.* Intravascular hemolysis associated with *Candidatus Mycoplasma hematoparvum* in a nonsplenectomized dog in the south region of Iran. **Vet. Res. Forum**, v.5, p. 243-246, 2014.

SHARIFIYAZDI, H., *et al.* Genetic characterization and phylogenetic analysis of hemotrophic mycoplasmas in camel (*Camelus dromedarius*). **Comp. Clin. Pathology**, p. 1-6, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2666-9>

SHI, H., *et al.* Molecular investigation of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in goats and sheep in central China, **Transbound. Emerg. Dis.**, v.66, p.22–27, 2019.

SMITH, J.A., *et al.* Eperythrozoon wenyonii infection in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.196, n.8, p.1244- 50, 1990. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19902206665> Acesso em: 15 jul. 2020.

SONG, Q., et al. Detection of *Mycoplasma wenyonii* in cattle and transmission vectors by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v.45, p. 247–250, 2013. DOI 10.1007/s11250-012-0197-y

SOUZA, U.A., et al. First molecular detection of *Mycoplasma ovis* (Hemotropic mycoplasmas) from Sheep in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 28, n. 3, p. 360-366, jul.-set. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019022>

SU, Q.L., et al. The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China **Trop. Anim. Health. Prod.** v. 42, p.1805–1808, 2010.

SYKES, J.E., et al. Human coinfection with *Bartonella henselae* and Two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. **J. Clin. Microbiol.** v.48, p. 3782–3785, 2010. DOI:10.1128/JCM.01029-10

TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle in Hokkaido. Japan. **Vet. Microbiol.** v.132, p.177–180, 2008.

TAGAWA, M., et al. Effect of chronic hemoplasma infection on cattle productivity. **J. Vet. Med. Sci.** v.75, n. 10, p. 1271-75, 2013. doi: 10.1292/jvms.13-0119.

TAGAWA, M., et al. Prevalence and Risk Factor Analysis of Bovine Hemoplasma Infection by Direct PCR in Eastern Hokkaido, Japan. **J. Vet. Med. Sci.** v.74, n.9, p.1171–76, 2012. doi: 10.1292/jvms.12-0118

TAGAWA, M., et al. Effect of chronic hemoplasma infection on cattle productivity. **J. Vet. Med. Sci.**, v.75, p.1271-1275, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942926/>>. Accessed: Nov. 11, 2015. doi: 10.1292/jvms.13-0119.

WANG, J., et al. Detection of *Eperythrozoon wenyonii* by PCR assay. **Front. Agri. China.** v.3, n.1, p.100-103, 2009.

WANG, X., et al. Molecular characterization of hemotropic mycoplasmas (*Mycoplasma ovis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemovis*’) in sheep and goats

in China. **BMC Vet. Res.**, v.13, n.142, p. 1-8, 2017. DOI 10.1186/s12917-017-1062-z

WATANABE, M., et al. Molecular detection of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' Infection in cats by direct PCR using whole blood without DNA extraction. **J. Vet. Med. Sci.** v.70, p. 1095–1099, 2008.

WILLI, B. et al. Development and Application of a Universal Hemoplasma Screening Assay Based on the SYBR Green PCR Principle. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 12, p. 4049–4054, dec. 2009. doi:10.1128/JCM.01478-09

WILLI, B., et al. From Haemobartonella to hemoplasma: Molecular methods provide new insights, **Vet. Microbiol.** v.125, p. 197–209, 2007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.027>.

WITTER, R., et al. Prevalence of Candidatus Mycoplasma haemobos detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil, **Ciência Rural**. v.47, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160805>.

YBAÑEZ, A.P., et al. First molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and the ectoparasite biodiversity in dairy water buffalo and cattle in Bohol, Philippines. **Parasit. International**. v.70, p.77-81, 2019.

4 CAPÍTULO 3: BÚFALOS E ASPECTOS DA LEPTOSPIROSE – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMO: Dentre as enfermidades infectocontagiosas que podem afetar a produção e reprodução de bubalinos está a leptospirose. É causada pela *Leptospira* spp., uma espiroqueta, que pode ser classificada sorologicamente ou genotipicamente. Os búfalos são considerados reservatórios do sorovar Hardjo, principal sorovar que acomete bubalinos. A leptospirose tem maior ocorrência em locais com clima tropical, subtropical ou temperado, onde o clima é úmido e chuvoso. Roedores e outros animais silvestres são importantes reservatórios e fonte de infecção da bactéria para bubalinos e outras espécies de animais. Os hábitos dos búfalos podem ser um fator predisponente à infecção, assim como a densidade animal e a não utilização da inseminação artificial nos rebanhos. A prevalência da leptospirose varia em rebanhos bubalinos no Brasil e no mundo. A principal forma de infecção é por contato direto ou indireto com urina de animais portadores ou infectados, mas a transmissão venérea também deve ser considerada. A doença tem as fases de leptospiremia e leptospirúria e pode durar de meses a anos. Os sinais clínicos podem ser febre, icterícia, hemoglobinúria, mas a forma subclínica é comum e caracterizada por abortamentos e redução da fertilidade. Os principais métodos diagnósticos são pela técnica de Soroaglutinação Microscópica e Reação da Cadeia em Polimerase. Para profilaxia e controle é importante o controle de roedores e possíveis portadores da doença, assim como a vacinação dos rebanhos e tratamento dos animais portadores assintomáticos e sintomáticos.

Palavras-chave: Leptospira, bubalinos, Hardjo, icterícia, infertilidade.

BUFFALOES AND ASPECTS OF LEPTOSPIROSIS – A REVIEW

ABSTRACT: Among the infectious diseases that can affect the production and reproduction of buffalo is leptospirosis. It is caused by *Leptospira* spp., a spirochete, which can be classified serologically or genotypically. Buffaloes are considered reservoirs of the Hardjo serovar, the main serovar affecting them.

Leptospirosis is more common in places with tropical, subtropical or temperate climates, where the climate is humid and rainy. Rodents and other wild animals are important reservoirs and sources of infection of the bacteria for buffalo and other animal species. The habits of buffaloes may be a predisposing factor to infection, as well as animal density and the non-use of artificial insemination in herds. The prevalence of leptospirosis varies in buffalo herds in Brazil and worldwide. The main form of infection is by direct or indirect contact with urine from infected or carrier animals, but venereal transmission should also be considered. The disease has the phases of leptospiremia and leptospiraemia and can last from months to years. Clinical signs can be fever, jaundice, hemoglobinuria, but the subclinical form is common and characterized by abortions and reduced fertility. The main diagnostic methods are by Microscopic Serum Agglutination and Polymerase Chain Reaction. For prophylaxis and control it is important to control rodents and possible carriers of the disease, as well as vaccinating herds and treating asymptomatic and symptomatic carriers.

Key-words: Leptospira, buffaloes, Hardjo, jaundice, infertility

4.1 INTRODUÇÃO

Búfalos são animais de fácil adaptação a diferentes condições geoclimáticas (VIANA et al., 2009). Apesar de serem considerados animais rústicos, estes podem ser afetados por enfermidades que influenciam negativamente na sua produção e reprodução (GUEDES et al., 2020a; CONTRERAS; FIGUEREDO; CARRILO, 2012). Entre as doenças infectocontagiosas que afetam a sanidade, produção e desempenho reprodutivo dos bubalinos, pode-se destacar a leptospirose.

A leptospirose é uma zoonose emergente de distribuição mundial e acomete animais domésticos, silvestres e o ser humano (DE LIMA BRASIL et al., 2015; PAIXÃO et al., 2016). É uma doença grave, que por vezes é negligenciada por falta de informação e conhecimento sobre a extensão da doença e suas consequências (WHO, 2011). Além do impacto social e sanitário

da leptospirose, esta também causa prejuízos econômicos devido à infertilidade e abortamentos (OLIVEIRA; ARSKY; PACHECO DE CALDAS, 2013; ELLIS, 2015). O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre a leptospirose e suas particularidades quando acomete búfalos e também, realizar um levantamento da prevalência de infecção de bubalinos por leptospirose no Brasil e no mundo.

4.2 AGENTE ETIOLÓGICO E PATOGENIA

A leptospirose é causada por bactéria espiroqueta do gênero *Leptospira*, pertencente à família Leptospiraceae da ordem Spirochetales (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; OLIVEIRA; ARSKY; PACHECO DE CALDAS, 2013). São bactérias helicoidais gram-negativas móveis, aeróbias e de crescimento lento, que necessitam de meios especiais para cultura (LI et al., 2000; CHIDEROLI et al., 2017). A classificação da *Leptospira* spp. pode ser sorológica, que define sorovares e sorogrupos, enquanto a classificação genotípica define genomo espécies baseadas na similaridade do DNA entre as cepas bacterianas (GUERNIER; ALLAN; GOARANT, 2018). As classificações sorológicas e genotípicas não estão associadas, e os sorovares patogênicos e não patogênicos podem pertencer à mesma genomo espécie (LEVETT, 2004).

A *Leptospira* spp. possui cerca de 300 sorovares patogênicos, divididos em 25 sorogrupos de acordo com a sua similaridade antigênica (VINCENT et al., 2019; WHO, 2013). *Leptospira interrogans* compreende todas as leptospirosas patogênicas e *L. biflexa* representa as leptospirosas saprófitas isoladas no ambiente (LEVETT, 2001). Alguns sorovares apresentam afinidade por determinadas espécies, mas podem infectar outras espécies susceptíveis (LANGONI, et al., 1999). A classificação baseada na sorologia é utilizada principalmente para finalidades epidemiológicas (DI AZEVEDO et al., 2020)

Mecanismos moleculares da patogenia da leptospirose ainda são pouco elucidados. A patogenicidade da *Leptospira* depende de fatores como os lipopolissacarídeos de membrana, hemolisinas, proteínas de membrana e de superfície, moléculas de adesão ou genes bacterianos, como o ClpB

(EVANGELISTA; COBURN, 2010; KEDZIERSKA-MIESZKOWSKA; ARENT, 2020).

4.3 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose ocorre principalmente em países de clima tropical, subtropical e temperado, especialmente durante o período de altos índices pluviométricos (VIEIRA; PINTO; LILENBAUM, 2018). As leptospirosas podem sobreviver fora do hospedeiro por longos períodos em ambientes quentes e chuvosos, com pH neutro e umidade, contaminando a lama, terrenos úmidos, barro, pântanos, córregos, lagos e vegetação (SAITO et al., 2013; HASSANPOUR; MOUSAVI, 2007; WASINSKI; DUTKIEWICZ, 2013).

Locais onde há esgotos a céu aberto ou onde ocorrem enchentes, alagamentos ou inundações representam grande risco para propagação da doença (CHADSUTHI et al., 2018). A presença de roedores, cervídeos, capivaras, gambás e outras espécies silvestres no ambiente, que podem atuar como reservatórios de *Leptospira* spp. e transmiti-las para o rebanho ou seres humanos (CASTRO et al., 2008; ASSENGA, 2015).

Além de animais silvestres, a criação conjunta de diversas espécies de animais pode predispor a transmissão da leptospirose (PAIXÃO et al., 2016). A densidade animal também é um dos fatores de risco para transmissão da leptospirose, a qual favorece o contato dos animais com vegetações e ambientes contaminados, especialmente com urinas, restos placentários ou fetos caso haja a presença de animais soropositivos (PAIXÃO et al., 2016; CHADSUTHI et al., 2017).

Quando se trata de bubalinos, o hábito destes animais de se banhar em áreas alagadiças ou na lama para realizar a termorregulação corporal e proteção contra ectoparasitas é um dos principais fatores de risco para a infecção desta espécie pela leptospirose (NAPOLITANO et al., 2013). Este comportamento facilita o consumo e o contato da água contaminada por roedores ou mesmo por outros bubalinos ou animais portadores que urinaram

nestas áreas com as mucosas oculares, nasais, oral ou genital dos animais (GIRALDO et al., 2014; HAJIKOLAEI et al., 2006).

Conhecimento sobre a distribuição da doença em uma determinada área e seus hospedeiros acidentais e reservatórios são essenciais para entender a epizootiologia da doença (BALAMURUGAN et al., 2016). Os sorovares envolvidos podem variar de região para região dependendo das espécies animais de contato, dos sorovares existentes, das condições ambientais e climáticas, além do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta (ELLIS, 1984).

Bovinos são conhecidos principal reservatório ou hospedeiro natural de *Leptospira* sorogrupo Sejroe, principalmente o sorovar Hardjo, que pode sobreviver em seu organismo por anos (HATHAWAY; LITTLE; PRITCHARD, 1986). Dois genótipos do sorovar Hardjo são encontrados em ruminantes: o Hardjobovis, pertencente à espécie *L. borgpetersenii*, e o Hardjoprajitno, pertencente à espécie *L. interrogans* (ELLIS, 2015; NALLY et al., 2018). Estes dois tipos do sorovar Hardjo são sorologicamente idênticos, mas geneticamente distintos e estão associados principalmente à Leptospirose Genital Bovina (LGB) (OLIVEIRA et al., 2009; LOUREIRO; LILIENBAUM, 2020).

Assim como em bovinos, bubalinos também são acometidos principalmente pelo sorovar Hardjo, e por este motivo também são considerados reservatórios deste sorovar (GUEDES et al., 2020b; KENAR; OZDEMIR, 2013; ASSENGA et al., 2015). Há relatos de bubalinos infectados por outros sorovares, tais como o Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Australis, Wolffi, Pomona ou Canicola, por exemplo, que pode ocorrer pela sua interação com roedores ou outros animais silvestres no ambiente (JANSEN et al., 2007; LANGONI et al., 1999; KENAR; OZDEMIR, 2013). Outra variante do sorogrupo Sejroe, *L. santarosai* sorovar Guaricura foi encontrado em bovinos e bubalinos no Brasil (VASCONCELLOS et al., 2001; LOUREIRO et al., 2016).

Leptospirose em búfalos já foi detectada em diversos países no mundo com diferentes prevalências variando de 2,3% a 88% (OLMO et al., 2018;

SELVARAJ et al., 2010). Informações sobre a prevalência de leptospirose em bubalinos em alguns países no mundo estão descritas na tabela 4.

TABELA 4 – DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUNS TRABALHOS NA LITERATURA QUE APRESENTAM A PREVALÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM BUBALINOS EM ALGUNS PAÍSES NOS ÚLTIMOS ANOS.

País	Prevalência (%)	Autores
Argentina	22,2%	Konrad et al., 2013
Caribe, Trinidad	14,6%	Adesiyunet al., 2009
Colômbia	37,3%	Giraldo et al., 2014
Egito	25%	Felt et al., 2011
Egito	15,4%	Samir et al., 2015
Filipinas	48%	Villanueva et al., 2016a
Filipinas	17,3%	Villanueva et al., 2016b
Índia	67,18%	Alamuri et al., 2019
Índia	15,69%	Patel et al., 2016
Índia	88%	Selvaraj et al., 2010
Iran	58,73%	Hajikolaei et al., 2006
Iran	35,29%	Mohammad, 2014
Itália	6,8%	Tagliabue et al., 2016
Lao	2,3%	Olmo et al., 2018
Nepal	37%	Shrestha et al., 2018
Paquistão	12,69%	Ijaz et al., 2020
Tailândia	28,1%	Chadsuthi et al., 2017
Tailândia	30,5%	Suwancharoen et al., 2013
Tanzânia	28,95%	Assenga et al., 2015
Turquia	32,26%	Kenar; Ozdemir, 2013
Uganda	42,39%	Atherstone et al., 2014

FONTE: O autor, 2022.

No Brasil, nos últimos anos a frequência de bubalinos soropositivos para leptospirose varia de 2,4% a 80%, e o sorovar de maior prevalência é o Hardjo, como pode-se observar na tabela 5 (GUEDES et al., 2020a; FAVERO et al., 2002; ROCHA et al., 2019; VIANA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2018).

TABELA 5 – SOROPREVALÊNCIA DE LEPTOSPIRA EM BUBALINOS EM DIVERSOS ESTADOS BRASILEIROS.

Município/ Estado	Prevalência	Principais sorovares	Autores
Sudeste			
São Paulo	43,7%	Hardjo e Pomona Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Hardjo	Favero et al., 2002
Vale do Ribeira em São Paulo	37,7%		Langoni et al., 1999
São Paulo	50,9%	Australis, Autumnalis e Castellonis Sejroe, Hardjo, Wolffi	Fujii et al., 2001
Uberlândia, Minas Gerais	56,25%		Mendes et al., 2018
Nordeste			
Maranhão	70,58%	Pomona, Butembo e Icterohaemorrhagiae	Carvalho et al., 2015
Paraíba	27,9%	Bratislava, Pomona e Canicola	De Lima Brasil et al., 2015

Pernambuco	28,5%	Sejroe, Hardjoprajitno e Hardjo	Oliveira et al., 2018
Norte			
Amapá	2,4%	Hardjo	Guedes et al., 2020a
Amazonas	63,6%	Hardjo, Autumnalis e Pomona	Guedes et al., 2020b
Belém	35,4%	Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Djasiman	Rocha et al., 2019
Ilha do Marajó e Pará	80%	Autumnalis, Hardjo e Wolffi	Viana et al., 2009
Pará	34,27%	Sentot, Hardjo e Australis	Oliveira et al., 2013
Pará	67,72%	Hardjo, Grippotyphosa, Pomona	Silva et al., 2009

FONTE: O autor, 2022.

4.4 TRANSMISSÃO

O mecanismo de transmissão da leptospirose envolve infecções acidentais, na qual o animal se infecta por um sorovar não adaptado a sua espécie eliminado por um portador de outra espécie, como roedores ou outros animais silvestres (ELLIS, 2015). Pode ocorrer a infecção por sorovares adaptados, onde indivíduos portadores transmitem o patógeno para animais da mesma espécie, que também serão portadores (LOUREIRO; LILENBAUM; 2020).

Infecção de animais e seres humanos pela *Leptospira* frequentemente ocorre por contato direto com a urina ou materiais biológicos de animais portadores ou clinicamente doentes ou de forma indireta pelo contato com água, solo ou vegetação contaminada (GUERNIER; ALLAN; GOARANT, 2018). Bebedouros, alimentos e rações de animais confinados também podem estar contaminados (ASSENGA et al., 2015).

A mobilidade conferida às *Leptospiras* pela presença de flagelos periplasmáticos permite a bactéria invadir o organismo do hospedeiro por penetração ativa na pele danificada ou mucosas intactas (ELLIS, 2015; EVANGELISTA; COBURN, 2010). Deste modo, os animais se infectam por meio do contato com a mucosa oral, nasal, genital ou por contato com abrasões na pele (BAQUERO; GÓMEZ; HERNÁNDEZ, 2010). Após um ou dois dias da infecção se inicia o período de bacteremia, que pode durar uma semana. Esta é a fase aguda da doença, que está geralmente associada à

infecção acidental com os sorovares Pomona e Icterohaemorrhagiae, que possui alta morbidade e alta mortalidade (LEVETT, 2001; ELLIS, 2015).

Na fase de letospiremia a *Leptospira* se dissemina pela corrente sanguínea se multiplicando ativamente, colonizando outros órgãos como fígado, rins, órgãos reprodutivos do macho e da fêmea, membranas fetais, feto, glândula mamária, baço, pulmões e sistema nervoso central (BAQUERO; GÓMEZ; HERNÁNDEZ, 2010; MARIANELLI et al., 2007; ADLER, 2014). Nestes locais podem ser ocasionados danos tissulares severos em decorrência das toxinas leptospirais e os sinais clínicos do quadro agudo se manifestam (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Durante este período a *Leptospira* spp. pode ser isolada de sangue e amostras de órgãos (ELLIS, 2015).

Após essa fase inicial a quantidade de leptospiros na circulação diminui e elas ficam restritas aos tecidos, dentre eles os rins, principalmente no epitélio dos túbulos renais proximais, onde se multiplicam e são eliminadas na urina (LEVETT, 2001). Essa é a forma crônica da doença, denominada leptospirúria, que pode durar de meses a anos e varia entre espécies de hospedeiros, também denominados portadores assintomáticos, e sorovar infectante (ELLIS, 2015; ADLER, 2014; GALIERO, 2007).

A perda da eficiência reprodutiva é uma das principais consequências em portadores assintomáticos e já foram encontradas leptospiros no oviduto e útero de fêmeas não prenhas e no trato genital de machos (GALIERO, 2007; OLIVEIRA et al., 2009). A bactéria também já foi identificada em fluidos vaginais de fêmeas ou no sêmen (MASRI et al. 1997; LOUREIRO et al. 2017).

As leptospiros quando presentes no trato reprodutivo da fêmea podem interferir na implantação embrionária. Eventualmente o agente pode atravessar a placenta e infectar o feto, causando a morte embrionária e abortamento (PLUNKETT et al., 2013). Por conta disso os fetos, placenta e fluidos de animais contaminados, mesmo que aparentemente saudáveis, também podem ser fonte de infecção para outros animais e seres humanos (BALAMURUGAN et al., 2016).

4.5 SINAIS CLÍNICOS

Os animais infectados pela *Leptospira* podem adoecer, mas a maioria se torna portador assintomático (OLIVEIRA; ARSKY; PACHECO DE CALDAS, 2013; FELT et al., 2011). O quadro clínico da leptospirose em bubalinos é similar ao dos bovinos (GALIERO, 2007). Búfalos infectados apresentando a forma aguda da doença podem apresentar depressão, anorexia, febre, icterícia, queda na produção de leite e mastite, caracterizada pelo úbere flácido e leite com coágulos de sangue, hemoglobinúria (AHMED, 1990; GAROUSSI et al., 2017; HASSANPOUR; MOUSAVI, 2007; FELT et al., 2011).

Os animais que sobrevivem ao quadro agudo evoluem para o quadro crônico se tornando portadores geralmente assintomáticos, que apresentam repetição de estro e altas taxas de abortamentos (ELLIS, 2015; LOUREIRO; LILENBAUM, 2020; IJAZ et al., 2020; GALIERO, 2007; MARIANELLI et al., 2007). Em razão disto, LOUREIRO; LILENBAUM (2020) sugeriram que a leptospirose “silenciosa” que afeta a reprodução fosse considerada uma síndrome, denominada Leptospirose Genital Bovina (LGB).

A LGB é causada principalmente pelo sorovar Hardjo, e é associada a perdas embrionárias precoces e repetição de estro, muito provavelmente pela inflamação uterina ou contaminação do embrião pela *Leptospira* (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020; MORI et al., 2017). Isto ocorre principalmente no terço final da gestação, causando morte fetal, com ou sem a degeneração da placenta e expulsão dos fetos algumas semanas após a infecção, sendo possível detectar a infecção por *Leptospira* em fetos abortados (MARIANELLI et al., 2007). Pode ocorrer o nascimento de bezerros com leptospirose congênita, mas estes nascem debilitados (ELLIS, 2015).

4.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de leptospirose é feito com base no histórico epidemiológico e possíveis sinais clínicos e confirmado por métodos sorológicos ou moleculares (LEVETT, 2001). O diagnóstico de leptospirose em

animais depende da coleta adequada de material biológico e o estágio da infecção (DI AZEVEDO et al., 2020).

Levett (2001) afirmou que é possível determinar a provável fase de infecção por meio dos resultados dos testes utilizados. Na fase de leptospiremia as leptospiras podem ser encontradas no sangue e tecidos como o fígado nos primeiros dez dias, portanto a técnica de PCR e cultura são mais eficazes para o diagnóstico nessa fase. Na fase de leptospirúria os patógenos podem ser encontrados na urina e rins de animais infectados e a produção de anticorpos (AC) contra a infecção já está elevada, por este motivo a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) identifica AC a partir do final da fase aguda até meses após a infecção.

A SAM é considerada o padrão ouro de diagnóstico para leptospirose (WHO, 2013). Este teste é utilizado para a detecção de AC para os diferentes sorogrupos e sorovares de *Leptospira* por meio de mensuração dos títulos de imunoglobulina G e imunoglobulina M, que possuem pico após 10 a 20 dias de infecção e diminuem entre seis e 12 meses (PRITCHARD, 2001; ASSENGA, 2015). Títulos maiores ou iguais a 1:100 são considerados positivos (WHO, 2011).

O teste possui maior sensibilidade para identificar sorogrupos do que do sorovares, de modo que nem sempre é possível ter certeza do sorovar infectante (SYKES et al., 2011). Reações cruzadas podem acontecer quando os infectados produzem AC que reagem a diversos sorovares simultaneamente (LEVETT, 2001).

Quando as amostras são coletadas na fase aguda da doença em que ainda não há produção de AC, podem ocorrer resultados falso-negativos na SAM (DENEKE et al., 2014). A detecção da doença na forma crônica em animais reservatórios também pode obter resultados falso-negativos, pois animais estes podem apresentar títulos abaixo dos níveis detectáveis (NALLY et al., 2018). A SAM pode também sofrer interferência de AC vacinais, resultando em resultados falso-positivos ou diagnosticando sorovares provenientes das vacinas (NARDI JUNIOR et al., 2010). Em razão destas

condições citadas, técnicas moleculares vêm sendo bastante utilizadas para classificação das espécies de *Leptospira* spp. (COSATE et al., 2017).

O diagnóstico molecular para detecção e amplificação do DNA de *leptospira* pela PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade (HAMOND et al., 2014). Urina, sangue, fluidos genitais e diversos tecidos podem ser utilizados para diagnosticar a *Leptospira* spp. por PCR (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020; DI AZEVEDO et al., 2020). A utilização de tecidos corporais é interessante após a morte do animal e nos casos de abortos é interessante avaliar o sangue e tecidos embrionários, como fígado, fluidos oculares, rins e tecidos respiratórios (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; DI AZEVEDO et al., 2020). Em casos de suspeita de LGB, a chance de encontrar leptospiros na descarga vaginal foi duas vezes maior do que nos rins e urina (LOUREIRO et al., 2017).

A PCR teste pode diagnosticar casos agudos de leptospirose, uma vez que detecta o DNA bacteriano, não depende da resposta imune à infecção e permite a identificação de espécies sem a necessidade de isolamento bacteriano (WAGGONER; PINSKY, 2016; LOUREIRO et al. 2016; GUEDES et al. 2019). Este método também possui algumas limitações, pois ainda não possui padronização da técnica e podem-se utilizar diferentes marcadores genéticos, dificultando a comparação entre resultados, além de seu alto custo na compra de kits diagnósticos (DI AZEVEDO et al., 2020).

Outro método sorológico que pode ser utilizado é o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), que possui 90% de correlação com os resultados da SAM (KHANAL et al., 2018). O teste de ELISA utiliza antígenos celulares para o diagnóstico e é relativamente sensível (DENEKE et al., 2014).

O cultivo da *Leptospira* não é rotineiramente utilizado, pois é um método difícil, caro, demorado e pouco sensível (REAGAN; SYKES, 2019; OIE, 2012; ELLIS, 2015). A cultura de leptospiros é exigente e é susceptível a contaminações, por isso deve ser realizada em meios especiais líquidos ou semissólidos (ágar 0,1 – 0,2%) contendo albumina sérica bovina (BSA), Tween 80 (Polisorbato 80, emulsificante e surfactante) ou uma combinação de Tween

80 and Tween 40 (CHIDEROLI et al., 2017; ELLIS, 1984). A contaminação da cultura pode ser controlada com a adição de antibióticos como a fosfomicina, rifamicina, polimixina ou neomicina (OIE, 2012).

A visualização microscópica direta das bactérias do gênero *Leptospira* spp. também tem suas limitações, pois estas bactérias não são coradas por corantes convencionais utilizados para visualização microscópica de bactérias, sendo necessária a visualização em microscopia de campo escuro (GALIERO, 2007). Amostras de sangue, urina e leite de animais infectados podem ser avaliadas por este método, mas sua sensibilidade e especificidade são baixas, portanto não é rotineiramente utilizado (ELLIS, 2015; REAGAN; SYKES, 2019).

4.7 CONTROLE E PREVENÇÃO

Além do diagnóstico, medidas de prevenção com relação à saúde pública incluem a conscientização da população quanto à presença da doença, seus fatores de risco, modo de transmissão e controle são importantes (CHADSUTHI et al., 2017). A identificação dos sorovares circulantes em determinadas regiões é essencial para a elaboração de controle estratégico da enfermidade (ELLIS, 2015).

O controle de roedores e outros possíveis transmissores da leptospirose, como capivaras, é parte importante das medidas de controle e prevenção da enfermidade (NARDI JUNIOR et al., 2010; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). É recomendado realizar também o controle de fatores ambientais, tais como eliminação do excesso de água do ambiente, fornecimento de água e alimentos limpos e de qualidade, higiene dos equipamentos (NARDI JUNIOR et al., 2010; LEVETT, 2001).

Deve-se evitar a criação dos animais em meio urbano, principalmente em locais sem saneamento básico adequado, controle de inundações ou enchentes e manutenção de áreas alagadas (LEVETT, 2001). Não se indica a criação de diversas espécies em conjunto e a alta densidade de animais em uma mesma área (PAIXÃO et al., 2016).

A vacinação é um método importante e relativamente barato de prevenção, que proporciona imunidade humoral aos animais, protegendo-os contra a manifestação de sinais clínicos da leptospirose (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020). O reconhecimento e caracterização de leptospirosas que afetam determinada região são fundamentais para a produção de vacinas eficazes que contenham sorovares presentes na região de interesse (COSATE et al., 2017). No Brasil as vacinas comerciais disponíveis no mercado são compostas por cinco a 10 sorovares, que atendem as soroprevalências de algumas regiões do país (CASTRO et al., 2008).

Outra medida profilática é o isolamento e tratamento de animais soropositivos, seja portadores assintomáticos ou com sinais clínicos evidentes (LEVETT, 2001). O tratamento deve ser com antibióticos para interromper a multiplicação e excreção da *Leptospira* spp. na urina, visando diminuir o número de animais infectados no rebanho e consequentemente diminuir a transmissão entre o rebanho (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020; ELLIS, 2015). A dihidroestreptomicina é o antibiótico recomendado para o tratamento da leptospirose (GERRITSEN et al., 1994). Outros antibióticos como a oxitetraciclina, tilmicosina e ceftiofur também tiveram resultados satisfatórios no tratamento de leptospirose (ALT et al., 2001).

Uma forma de prevenção para a LGB é a utilização de inseminação artificial ou outras biotécnicas da reprodução nos rebanhos (GIVENS, 2018; LOUREIRO; LILENBAUM, 2020). Entretanto, mesmo com o uso de biotecnologias da reprodução também pode ocorrer a transmissão de leptospirose. Estudos em que o embrião foi fertilizado *in vitro* demonstram que este pode ser danificado pelas leptospirosas, podendo infectar a receptora também (BIELANSKI; SURUJBALLI, 1998). Leptospirosas também podem sobreviver às baixas temperaturas em que o sêmen é armazenado quando congelado (EAGLESOME; GARCIA, 1992). Por este motivo os meios utilizados para o manuseio, cultivo e armazenamento de embriões são suplementados com estreptomicina e penicilina, assim como os meios de diluição do sêmen (BIELANSKI, 2007; GIVENS, 2018; DI AZEVEDO et al., 2020; LOUREIRO; LILENBAUM, 2020).

A leptospirose é uma enfermidade presente nos rebanhos bubalinos no Brasil e no mundo. A presença de roedores e outros animais silvestres portadores, assim como condições ambientais em algumas regiões e a falta de sanidade dos animais são fatores predisponentes para infecção. Os animais podem ser portadores assintomáticos ou apresentar manifestações clínicas, tais como febre e icterícia. Conclui-se que as medidas de prevenção e controle são o principal meio para evitar a propagação da doença.

REFERÊNCIAS

- ADESIYUN, A.A. et al. Leptospirosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Vet. Arhiv**, v.79, p.77–86, 2009. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/med-17784>. Acesso em: abril 2021.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.** v.140, n.3, p.287–96, 2010.
- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 172, n. 3-4, p. 353-461, 2014. DOI: 10.1016/j.
- AHMED, R. Leptospiral infection in lactating buffaloes. **Pakistan Vet. J.**, v.10, n. 98, 1990.
- ALAMURI, A. et al. Seroprevalence and distribution of serogroup-specific pathogenic *Leptospira* antibodies in cattle and buffaloes in the state of Andhra Pradesh, India. **Vet. World**, v.12, n.8, p.1212-1217, 2019. Doi: 10.14202/vetworld.2019.1212-1217
- ALT, D.P.; ZUERNER, R.L.; BOLIN, C.A. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.219, n.5, p.636-639, 2001.
- ASSENGA, J.A. et al. Predominant Leptospiral Serogroups Circulating among Humans, Livestock and Wildlife in Katavi-Rukwa Ecosystem, Tanzania. **PLoS Neglected Trop. Dis.** v.9, n.3, p. 1-14, 2015. Doi:10.1371/journal.pntd.0003607
- ATHERSTONE, C. et al. Short Report: Seroprevalence of *Leptospira* Hardjo in Cattle and African Buffalos in Southwestern Uganda. **Am. J. of Trop. Med. and Hygiene**, v.90, n.2, p. 288–290, 2014. doi: 10.4269/ajtmh.13-0466
- BALAMURUGAN, V. et al. Investigation on the Distribution of *Leptospira* Serovars and its Prevalence in Bovine in Konkan Region, Maharashtra, India.

Adv. Anim. Vet. Sci., v.4, n.2, p.19-26, 2016. Doi:

<http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.2s.19.26>

BAQUERO, M.P.; GÓMEZ, A.P.; HERNÁNDEZ, R.P. Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira* sp.. **Ver. Med. Vet.**, v.19, p.101-111, 2010.

BIELANSKI, A.B.; SURUJBALLI, O. *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjobovis in bovine embryos fertilized in vitro. **Can. J. Vet. Res.**, v.62, p.234-236, 1998.

BIELANSKI, A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. **Theriogenology**, v.68, p. 1-22, 2007.

CARVALHO, O.S. et al. Occurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. **African J. Microbiol. Res.**, v.9, n.9, p.598-603, mar. 2015.

CASTRO, V. et al. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.75, n.1, p.3-11, jan./mar. 2008.

CHADSUTHI, S. et al. Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and livestock in Thailand, 2010-2015. **PLoS Neglected Trop. Dis.**, v.11, n.2, p. 1-18, 2017. doi:10.1371/journal.pntd.0005228

CHADSUTHI, S. et al. A remotely sensed flooding indicator associated with cattle and buffalo leptospirosis cases in Thailand 2011–2013. **BMC Infect. Dis.**, v.18, n.602, p.1-9, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3537-3>

CHIDEROLI, R.T. et al. Culture strategies for isolation of fastidious *Leptospira* serovar Hardjo and molecular differentiation of genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. **Frontiers in Microbiol.**, v.8, n.2155, p.1-8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.02155

CONTRERAS, A.M.; FIGUEREDO, G.M.; CARRILLO, A.C. Actualización de la Neosporosis bovina. **Conexión Agropecuaria**. v.2, n.1, p.49-66, 2012.

COSATE, M.R.V. et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. **BMC Vet. Res.**, v.13, n.177, p.1-12, 2017. DOI 10.1186/s12917-017-1081-9

DE LIMA BRASIL, A. W. et al. Occurrence of anti-*Brucella abortus* and anti-*Leptospira* spp. antibodies in buffaloes from Paraíba state, Northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p.2005-2012, 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n3Supl1p2005

DENEKE, Y. et al. Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. **Molecular and Cellular Probes**, p. 1-6, 2014. [dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2014.01.001](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.01.001)

DI AZEVEDO, M.I.N.; LILENBAUM, W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. **Letters in Applied Microbiology**, p.1-13, 2020. doi:10.1111/lam.13442

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas foetus*. **The Veterinarian Bulletin**, v.62, p.743-775, 1992.

ELLIS, W.A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Vet. Med.**, v.2, p.411-421, 1984.

ELLIS, W.A. Animal leptospirosis. In: ADLER, B. **Current Topics of Microbiol. and Immunol.** 387, Heidelberg, Springer Verlag, p.99-137, 2015. DOI 10.1007/978-3-662-45059-8_6

EVANGELISTA, K.V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v.5, n.9, p.1413–1425, set. 2010. doi:10.2217/fmb.10.102.

FAVERO, A.C.M. et al. Sorovares de leptospiros predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.613-619, 2002.

FELT, S.A. et al. Cross-Species Surveillance of *Leptospira* in Domestic and Peri-Domestic Animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt. **Am. J. of Trop. Med. and Hygiene**, v.84, n.3, p. 420–425, 2011.
doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0393

FUJII, T.U. et al. Anticorpos anti- *Neospora caninum* e contra outros agentes de abortamentos em búfalas da região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.68, n.2, p.5-9, jul./dez. 2001.

GALIERO, G. Causes of infectious abortion in the mediterranean buffalo. *Italian J. Anim. Sci.*, v.6, p.194–199, 2007. doi: 10.4081/ijas.2007.s2.194

GAROUSI, M.T. et al. The prevalence and control of bovine mastitis in *Leptospira* outbreak. **Comp. Clin. Pathology**, v.26, p.189–192, 2017. DOI 10.1007/s00580-016-2367-1

GERRITSEN, M.J. et al. Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infected cows shedding *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p.339-343, 1994.

GIRALDO, J.L.M. et al. Prevalencia de anticuerpos a *Brucella abortus*, *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* en hatos bovinos y bubalinos en el Departamento de Caquetá, Colombia. **Revista Salud Animal**, v.36, n. 2, p.80-89, 2014.

GIVENS, M.D. Review: risks of disease transmission through semen in cattle. **Animal**, v.12, p.165–171, 2018. doi:10.1017/S1751731118000708

GUEDES, I.B. et al. Circulating *Leptospira* species identified in cattle of the Brazilian Amazon, **Acta Tropica**, v.191, p.212-216, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.011>

- GUEDES, I.B. et al. Identification of Pathogenic *Leptospira* Species in the Urogenital Tract of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) From the Amazon River Delta Region, Brazil. **Frontiers in Vet. Sci.**, v.7, n.269, p.1-7, 2020a. doi: 10.3389/fvets.2020.00269
- GUEDES, I.B. et al. Prevalence of *Leptospira* serogroups in buffaloes from the Brazilian Amazon. **Vet. Med. Sci.**, v.6, p.433–440, 2020b. DOI: 10.1002/vms3.271
- GUERNIER, V.; ALLAN, K.J.; GOARANT, C. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. **Parasitology**, v.145, p.595–607, 2018.
- HAJIKOLAEI, M.R. et al. Seroprevalence of leptospiral infection In buffalo (*bubalus bubalis*). **Bulletin Vet. Instit. of Pulawy**, v.50, p.341-344, 2006.
- HAMOND, C. et al. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. **Vet. Res. Communications**, v.38, p.81-85, 2014. DOI 10.1007/s11259-013-9582-x
- HASSANPOUR, A.; MOUSAVI, G.H. A case report of leptospira grippotyphosa in the Azerbaijan buffalo in Iran. **Italian J. Anim. Sci.**, v. 6, n.2, p. 893-895, 2007.
- HATHAWAY, S.C; LITTLE, T.W.; PRITCHARD, D.G. Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations. **Vet. Record**, v.119, p.84-86, 1986. DOI: 10.1136/vr.119.4.84
- IJAZ, M. et al. Seroprevalence of leptospirosis and its association with reproductive and productive parameters from buffalo population of Rajanpur and Muzaffargarh districts of Pakistan. **J. Anim. Plant Sci.**, v.30, n.1, p. 1-7, 2020.
- JANSEN, A. et al. Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, German. **Emerging Infect. Dis.**, v.13, n.5, p.739–742, 2007. doi: 10.3201/eid1305.061302

KEDZIERSKA-MIESZKOWSKA, S.; ARENT, Z. AAA+ Molecular Chaperone ClpB in *Leptospira interrogans*: Its Role and Significance in Leptospiral Virulence and Pathogenesis of Leptospirosis. **Int. J. of Molec. Sci.**, v.21, 6645, p. 1-11, 2020. doi:10.3390/ijms21186645

KENAR, B.; OZDEMIR, V. The seroprevalence of Leptospirosis in Anatolian buffaloes in Turkey. **Rev. Med. Vet.**, v.164, n.6, p.331–335, 2013.

KHANAL, D.R. et al. Detection of Antibodies Against *Leptospira hardjo* in Large Ruminants of Nepal. **Acta Scientific Agriculture**, v.2, n. 12, p.131-133, 2018.

KONRAD, J.L. et al. Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., and Apicomplexa protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina. **Trop. Anim. Health and Production**, p.1-6, 2013. DOI 10.1007/s11250-013-0427-y

LANGONI, H. et al. Aglutininas antileptospíricas em búfalos do vale do ribeira, estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 305-307, 1999.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Reviews**, v.14, p.296 – 326, 2001.

LEVETT, P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis. **Clin. Appl. Immunol. Reviews**. v.4, p.435–448, 2004.

LI, C. et al. Spirochete periplasmic flagella and motility. **J. Molecular Microbiol. Biotechnology**, v.2, p.345–354, 2000.

LOUREIRO, A.P. et al. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro - Brazil reveals genetic proximity to sorovar Guaricura. **Res. Vet. Sci.**, v.105, p.249-253, 2016.

LOUREIRO, A.P. et al. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. **Anim. Reprod. Sci.**. 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.008>

LOUREIRO, A.P.; LILENBAUM, W. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. **Theriogenology**, v.141, p.41-47, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>

MARIANELLI, C. et al. Molecular detection of *Leptospira* species in aborted fetuses of water buffalo. **Vet. Record**, v.161. p.310–311, 2007. doi:

10.1136/vr.161.9.310

MASRI, S.A. et al. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. **Can. J. Vet. Res.**, v.61, p.15–20, 1997.

MENDES, A.F. et al. Ocorrência de animais com anticorpos anti-*Leptospira* spp. na região de Uberlândia, MG, 2011-2014. **Ver. Agropecuária Técnica**, v. 39, n. 3, p. 270-276, 2018. DOI: 10.25066/agrotec.v39i3.40383

MOHAMMAD, T. Prevalence of Serum Antibodies against Six *Leptospira* Serovars in Buffaloes in Tabriz, Northwestern Iran. **J. Buffalo Sci.**, v. 3, n.76-81, 2014.

MORI, M. et al. Reproductive disorders and leptospirosis: a case study in a mixed-species farm (cattle and swine). **Vet. Sci.**, v.4, n.64, p.2-9, 2017. doi:10.3390/vetsci4040064

NALLY, J.E. et al. Isolation and characterization of pathogenic leptospires associated with cattle. **Vet. Microbiol.**, v.218, p.25-30, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.023>

NAPOLITANO, F. et al. The behaviour and welfare of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in modern dairy enterprises. **Animal**, v.7, p.1704–1713, 2013.

<https://doi.org/10.1017/S1751731113001109>

NARDI JUNIOR, G. et al. An in vitro growth inhibition test for measuring the potency of *Leptospira* spp. Sejroe group vaccine in buffaloes. **Biologicals**, v. 38, p. 474-478, 2010.

OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th ed. Paris: **World Organization for Animal Health**, 2012.

OLIVEIRA, F.C.S. et al. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas Bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. **Arq. Inst. Biol.**, v.76, n.4, p.539-546, out./dez. – 2009.

OLIVEIRA, S.V.; ARSKY, M. de L.N.S, PACHECO DE CALDAS, E.
Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica. **Saúde** (Santa Maria), v.39, n.1, p. 9-20, 2013.

OLIVEIRA, G.C., et al. Pesquisa de anticorpos anti-leptospíricos em bubalino. **Ars Veterinaria**, p.29-33, 2013. doi: 10.15361/2175-0106.2013v29n4p33

OLIVEIRA, P. R. F. D. et al. Occurrence of serological reactions for serogroup Sejroe (CTG and Prajino) in female buffalo in the state of Pernambuco, Brazil. **Brazilian J.Microbiol.**, v.49, p.795–800, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.007>

OLMO, L. et al. Investigation of infectious reproductive pathogens of large ruminants: Are neosporosis, brucellosis, leptospirosis and BVDV of relevance in Lao PDR. **Acta Tropica**, v.177, p.118–126, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220335>

PAIXÃO, A.P. et al. *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes. **Arq. Instit. Biol.** v.83, p.1-12, 2016. DOI: 10.1590/1808-1657001022014

PATEL, J.M. et al. Seroepidemiological study of leptospirosis in buffaloes of south Gujarat, India. **Buffalo Bulletin**, v.35, n.3, 2016.

PLUNKETT, A.H. et al. Effect of a monovalent vaccine against *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain hardjobovis on fertility in Holstein dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.242, p.1564-1572, 2013. DOI: 10.2460/javma.242.11.1564

PRITCHARD, G. Milk antibody testing in cattle. **In Practice**. v.23, p.542-549, 2001. <http://dx.doi.org/10.1136/inpract.23.9.542>

REAGAN, K.L.; SYKES, J.E. Diagnosis of canine leptospirosis. **Vet. Clin. North America: Small Animal Practice**, v.49, p.719–731, 2019.

ROCHA, K.S. et al. Detecção de anticorpo anti-Brucella sp. e anti- Leptospira spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) abatidos em matadouro na cidade de Belém, Pará. **Rev. Ciências Agrárias**. p.62:4, 2019.
<http://dx.doi.org/10.22491/rca.2019.3046>

SAITO, M. et al. Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. **Appl. Env. Microbiol.**, v.79, n.2, p.601–609, 2013. doi:10.1128/AEM.02728-12

SAMIR, A. et al. Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range surveillance. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.48, n.3, p.272-277, Mai-Jun, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0102-2015>

SELVARAJ, J. et al. Seroprevalence of leptospirosis in she-buffaloes (*Bos bubalis*) at slaughter in Chennai, India. **Buffalo Bulletin**, v.29, n.2, 2010.

SHRESTHA, R. et al. Determinants of clinical leptospirosis in Nepal. **Zoonoses Public Health**, P.1–12, 2018. DOI: 10.1111/zph.12516

SUWANCHAROEN, D. et al. Serological survey of leptospirosis in livestock in Thailand. **Epidemiol. Infection**, v.141, n.2269–2277, 2013.
doi:10.1017/S0950268812002981

SYKES, J.E. et al. Small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment and prevention. **J. Vet. Internal Med.**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011. Doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x

TAGLIABUE, S. et al. Serological surveillance of Leptospirosis in Italy: two-year national data (2010-2011). **Vet. Italiana**, v.52, n.2, p.129-138, 2016. doi: 10.12834/VetIt.58.169.2

VASCONCELLOS, S. A. et al. Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Brazilian J. Microbiol.**, v.32, p.298-300, 2001.

VIANA, R.B. et al. Ocorrência de anticorpos anti- *Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *leptospira* spp. em búfalos (*bubalus bubalis*) criados na Amazônia. **Arq. Inst. Biol.**, v.76, p.453–457, 2009. doi: 10.13140/2.1.1966.1446

VIEIRA, A. S.; PINTO, P. S.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. **Trop. Anim. Health Prod.**, Edinburgh, v. 50, n. 2, p. 229-238, 2018. DOI: 10.1007/ s11250-017-1429-

VILLANUEVA, M.A. et al. Serological investigation of *Leptospira* infection and its circulation in one intensive-type water buffalo farm in the Philippines. **Japanese J. Vet. Res.**, v.64, n.1, p.15-24, 2016a. doi: 10.14943/jjvr.64.1.15

VILLANUEVA, M.A. et al. Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. among large ruminants in the Philippines. **J. Vet. Med. Sci.**, v.78, n.11, p.1649–1655, 2016b. doi: 10.1292/jvms.16-0289

VINCENT, A.T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Trop. Dis.**, v.13, p. 1-25, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>

WAGGONER, J.J.; PINSKY, B.A. Molecular diagnostics for human leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.29, p.440–445, 2016. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000295

WHO (World Health Organisation). Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. ISBN 978 92 4 150152 1. Printed by the **WHO Document Production Services**, Geneva, Switzerland. p.7-14, 2011.

WHO (World Organisation for Animal Health) (Office International des Épizooties -OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2013. OIE. Paris. Chapter 2.1.9., p. 251-264, 2013.

5. CAPÍTULO 4: FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Leptospira* spp. E SOROVARES PREDOMINANTES EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

RESUMO: A leptospirose é uma zoonose que pode acometer búfalos e é causada pela bactéria gram-negativa do gênero *Leptospira* spp. e a doença cursa com a fase de leptospiremia e leptospirúria. A infecção ocorre pelo contato com a urina ou ambiente contaminado com as mucosas dos animais. O objetivo deste trabalho foi determinar prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em bubalinos no estado do Paraná, Brasil, assim como os principais sorovares presentes. Um total de 296 amostras de sangue foram coletadas de bubalinos provenientes de 22 propriedades localizadas em diferentes municípios e mesorregiões do estado do Paraná. Foi realizado o teste de soroaglutinação microscópica para detectar a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e identificação de seus sorovares. A prevalência foi de 75,67% dos búfalos soropositivos para pelo menos um sorovar. O sorovar mais frequente foi o Icterohaemorrhagiae, com 69,59% de animais sororreagentes, seguido pelo sorovar Hardjo com 17,90% de bubalinos soropositivos e o terceiro sorovar mais frequente foi o Pomona com 17,56% dos animais soropositivos. Este é o primeiro trabalho que determina a prevalência da leptospirose em bubalinos no estado do Paraná. Medidas de prevenção e controle são importantes para controle da enfermidade nos rebanhos, que também é uma questão de saúde pública.

Palavras-chave: leptospirose, bubalinos, Icterohaemorrhagiae, sorologia

PREVALENCE OF *Leptospira* spp ANTIBODIES AND PREDOMINANT SOROVARS IN BUFFALOES (*Bubalus bubalis*) IN PARANÁ STATE, BRAZIL

ABSTRACT: Leptospirosis is a zoonosis that can infect buffaloes, it's caused by gram-negative bacteria of the genus *Leptospira* spp. and the disease progresses through the phases of leptospiremia and leptospiraemia. Infection occurs through contact with urine or contaminated environment with the mucous

membranes of the animals. The objective of this study was to determine the seroprevalence of leptospirosis in buffaloes in the state of Paraná, Brazil, as well as the main serovars present. A total of 296 blood samples were collected from bubalines from 22 properties located in different cities and mesoregions of Paraná state. A microscopic serum agglutination test was performed to detect the presence of anti-*Leptospira* spp. antibodies and to identify its serovars. The prevalence was 75.67% of buffaloes seropositive for at least one serovar. The most frequent serovar was Icterohaemorrhagiae, with 69.59% of seropositive animals, followed by the Hardjo serovar with 17.90% of seropositive buffaloes and the third most frequent serovar was Pomona with 17.56% of seropositive animals. This is the first study to determine the prevalence of leptospirosis in buffaloes in the state of Paraná. Prevention and control measures are important to control the disease in herds, which is also a public health issue.

Key-words: leptospirosis, bubalines, Icterohaemorrhagiae, sorology

5.1 INTRODUÇÃO

Búfalos são animais que se adaptam facilmente a diferentes condições geoclimáticas e são conhecidos pela sua rusticidade (VIANA et al., 2009; GUEDES et al., 2020a). Entretanto, torna-se necessário o conhecimento sobre enfermidades que afetem negativamente à sua produção, reprodução e fatores que influenciam diretamente na viabilidade econômica da produção destes animais (CONTRERAS; FIGUEREDO; CARRILO, 2012; VIANA et al., 2009). Dentre as doenças infectocontagiosas que afetam a sanidade, produção e reprodução dos bubalinos pode-se destacar a leptospirose, que também é importante sob o ponto de vista de saúde pública (CHADSUTHI et al., 2017).

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias gram-negativas do gênero *Leptospira* spp., pertencente à família Leptospiraceae, da ordem Spirochetales (PIMENTA et al., 2019; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; OLIVEIRA et al., 2013). A bactéria possui diversos sorovares patogênicos, cuja distribuição varia de acordo com a região, clima e hospedeiros susceptíveis

(BALAMURUGAN et al., 2016; LEVETT, 2004). As leptospirosas se proliferam principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, onde sobrevivem por longos períodos no ambiente quente, chuvoso e úmido (MILLER et al., 1991; SAITO et al., 2013). Estes microrganismos podem permanecer na lama, pantânos, lagos e vegetação (HASSANPOUR; MOUSAVI, 2007; WASINSKI; DUTKIEWICZ, 2013), locais onde os búfalos tem o hábito de se banharem, favorecendo a disseminação da leptospirose nesses animais (NARDI JUNIOR et al., 2011), uma vez que facilita o consumo e o contato das mucosas oculares, nasais, orais ou genitais com água contaminada pela *Leptospira* spp. (GIRALDO et al., 2014; HAJIKOLAEI et al., 2006).

A presença de roedores e outros animais silvestres, como capivaras, gambás ou cervídeos, que são importantes reservatórios da leptospirose no mesmo ambiente favorece a transmissão da enfermidade aos animais de produção e humanos (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; CASTRO et al., 2008; ASSENGA, 2015). A criação conjunta de diversas espécies de animais e a densidade animal também podem predispor a transmissão da leptospirose (PAIXÃO et al., 2016; CHADSUTHI et al., 2017). A transmissão venérea da leptospirose em bovinos e bubalinos também é uma importante forma de disseminação do agente nos rebanhos (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020).

A leptospirose possui duas fases: a fase de leptospiremia, que consiste na fase aguda, com manifestação de sinais clínicos, e a fase de leptospirúria, na qual a bactéria é eliminada pela urina do hospedeiro durante longos períodos, determinando a fase crônica da doença (LEVETT, 2001; ELLIS, 2015; ADLER, 2014). Bubalinos também podem ser reservatórios do patógeno, uma vez que apresentam o quadro assintomático e podem transmitir a doença para seres humanos e outros mamíferos (DENIPITIYA et al., 2017; FELT et al., 2011).

Na maioria das vezes a leptospirose em bubalinos cursa com quadro assintomático, caracterizada principalmente por problemas reprodutivos como repetição de estro e abortamentos no terço final da gestação (IJAZ et al., 2020; GALIERO, 2007; MARIANELLI et al., 2007). Em casos agudos da doença os búfalos podem apresentar sinais clínicos como letargia, anorexia, febre,

hemorragias, icterícia, agalactia, mastite, diarreia, abortamentos (OLIVEIRA et al., 2013; FELT et al., 2011; GALIERO, 2007).

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado por meio sorológico ou molecular (LEVETT, 2001). O teste de SAM é utilizado para detecção de AC para os diferentes sorogrupos e sorovares de *Leptospira* spp. (ASSENGA, 2015), sendo considerado positivo quando os títulos são maiores ou iguais a 1:100 (WHO, 2011).

Entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que determinam a prevalência de leptospirose em bubalinos no estado do Paraná, Brasil, desta forma, o objetivo do presente estudo foi realizar a prevalência e detecção dos principais sorovares de leptospirose em búfalos provenientes do estado do Paraná. Este é o primeiro trabalho a determinar a prevalência de bubalinos infectados por leptospirose no estado do Paraná.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras sanguíneas de 296 búfalos sadios provenientes de 16 municípios e 22 rebanhos do estado do Paraná. Os critérios de inclusão dos animais à pesquisa foram não possuir histórico de vacinação contra leptospirose e ser bubalino criados em propriedades rurais paranaenses. Estipulou-se a utilização de cerca de 10% dos animais de cada propriedade escolhidos de forma aleatória para colheita de amostras de sangue. Os animais utilizados no estudo eram provenientes de diferentes propriedades em diferentes cidades do estado do Paraná, como ilustrado na figura 2.

FIGURA 2 – MAPA DO ESTADO DO PARANÁ SUBDIVIDIDO EM MESORREGIÕES EM DIFERENTES CORES. NUMERAÇÃO RESPECTIVA AOS MUNICÍPIOS ONDE FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE SANGUE DE BUBALINOS EM CADA MESORREGIÃO.



Adaptado de: <https://lyrics-letra.com/PT/Ensino-Fundamental/Parana-Historia-Geografia-12>

FONTE: O autor, 2022.

1- CARAMBÉ; 2- CASTRO; 3- PONTA GROSSA; 4- LARANJEIRA DO SUL; 5- ADRIANÓPOLIS; 6- CAMPINA GRANDE DO SUL; 7- CAMPO LARGO; 8- CERRO AZUL; 9- MORRETES; 10- RIO BRANCO DO SUL; 11- UNIFLOR; 12- IBATI; 13- JAPIRA; 14- PINHALÃO; 15- SÃO MATEUS DO SUL; 16- TEIXEIRA SOARES.

Foram coletadas amostras de sangue de 296 bubalinos provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná, conforme a tabela 6. Coletou-se aproximadamente 20 mL de sangue de cada animal por meio da venopunção de jugular ou dos vasos coccígeos após contenção adequada dos animais. Tubos coletores de 10 mL sem anticoagulante com gel ativador de coágulos (BD, Vacutainer®) previamente identificados foram utilizados para a coleta do material. As amostras de sangue foram mantidas refrigeradas em caixas isotérmicas até a formação de coágulo sanguíneo e em foram centrifugadas a 600xG por 10 minutos, para subsequente separação e coleta de soro de cada amostra. O material foi armazenado em microtubos de capacidade de 1,5 mL devidamente identificados e congelado a -80°C até o momento de envio ao laboratório.

TABELA 6 – MESORREGIÃO E RESPECTIVOS MUNICÍPIOS DAS PROPRIEDADES VISITADAS PARA COLETA DE AMOSTRAS PARA O PRESENTE ESTUDO, NÚMERO DE PROPRIEDADES VISITADAS POR MUNICÍPIO E NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS POR MUNICÍPIO.

Mesorregião	Municípios	Número de propriedades coletadas por município	Número de amostras coletadas
Centro Oriental	Carambei	2	24
	Castro	1	4
	Ponta Grossa	1	22
Centro Sul	Laranjeiras do Sul	2	16
Metropolitana	Adrianópolis	2	13
	Campina Grande do Sul	1	31
	Campo Largo	1	7
	Cerro Azul	2	29
	Morretes	1	23
	Rio Branco do Sul	3	77
Norte Central	Uniflor	1	11
Norte pioneiro	Ibati	1	8
	Japira	1	4
	Pinhalão	1	7
Nordeste	São Mateus do Sul	1	14
	Teixeira Soares	1	6
TOTAL	16	22	296

FONTE: O autor, 2022.

As amostras de soro sanguíneo foram encaminhadas para o laboratório de doenças bacterianas da reprodução do Instituto Biológico de São Paulo, na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. O exame diagnóstico realizado foi a SAM para a detecção de AC para leptospirose e identificação dos seguintes sorovares: Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Grippotyphosa, Hardjo, Bataviae, Autumnalis, Bratislava, Pyrogenes, Shermani, Sentot, Guaricura, Whitcombi, Andamana e Patoc. Foram consideradas amostras reagentes as que possuíam títulos de diluição mínima de 1:100. Análise estatística foi realizada de maneira descritiva utilizando medidas de frequência.

O projeto obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo 043/2020.

5.3 RESULTADOS

Das 296 amostras coletadas de búfalos aparentemente saudáveis, 75,67% (224/296) foram positivas para ao menos um sorvar de *Leptospira* spp., com títulos variando de 1:100 até 1:800, enquanto 23,31% (69/296) amostras não foram reagentes a quaisquer dos sorovares testados. Na tabela 7 se encontram as prevalências para os respectivos sorovares, estão listados apenas os sorovares que tiveram pelo menos uma amostra sororeagente.

TABELA 7 – PREVALÊNCIA DE BUBALINOS PROVENIENTES DO ESTADO DO PARANÁ PARA OS DIFERENTES SOROVARES DE *LEPTOSPIRA* SPP. TESTADOS NO PRESENTE ESTUDO.

Sorovar	Reagentes		Não reagentes	
	n	%	n	%
Icterohaemorrhagiae	206	69,59%	87	30,41%
Canicola	3	1,01%	290	98,99%
Pomona	52	17,56%	241	82,44%
Grippotyphosa	30	10,13%	263	89,87%
Hardjo	53	17,90%	240	82,10%
Autumnalis	39	13,17%	254	86,83%
Bratislava	22	7,43%	271	92,57%
Pyrogenes	2	0,67%	291	99,33%

FONTE: O autor, 2022.

Os sorogrupos Icterohaemorrhagiae, Hardjo e Pomona foram os mais prevalentes nas amostras examinadas. Outros sorovares como Canicola, Grippotyphosa, Autumnalis, Bratislava e Pyrogenes também foram reagentes em algumas amostras. Não houve amostras reagentes para os sorovares Bataviae, Shermani, Sentot, Guaricura, Whitcombi, Andamana e Patoc (não incluídas na tabela 7).

Observou-se também que das 75,67% (224/296) amostras reagentes para no mínimo um dos sorovares. Dentre estas, 35,81% (106/296) foram reagentes a apenas um sorovar, 23,98% (71/296) foram reagentes a dois sorovares, enquanto 11,14% (33/296) foram reagentes a 3 sorovares, 3,37% (10/296) reagiram a quatro sorovares e 1,35% (4/296) reagiram a 5 sorovares diferentes.

Dentre as propriedades de onde amostras foram coletadas, 81,82% (18/22) possuíam pelo menos um animal soropositivo para leptospirose, enquanto 18,18% (4/22) não obtiveram nenhum animal reagente ao teste de SAM para leptospirose. A distribuição dos casos de leptospirose e os respectivos sorovares encontrados em cada propriedade estão ilustrados na tabela 8.

TABELA 8 – NÚMERO DE ANIMAIS SORORREAGENTES PARA DETERMINADO SOROVAR EM CADA PROPRIEDADE UTILIZADA PARA O ESTUDO, DE ACORDO COM O MUNICÍPIO E MESORREGIÃO DA PROPRIEDADE.

Mesoregião, município, nº rebanho	N total rebanho	Icteroh aemor rhagiae	Canico la	Po mo na	Grippe typhosa	Har djo	Autu mna lis	Bra tisla va	Pyro ge nes
Centro Oriental									
Castro/ rebanho 01	04	2	-	-	-	4	-	-	-
Ponta Grossa/ rebanho 02	22	13	-	8	1	7	1	3	1
Carambeí/ rebanho 03	20	11	-	2	-	-	-	2	-
Carambeí/ rebanho 04	04	2	-	-	-	-	-	-	-
Centro Sul									
Laranjeira do Sul/ rebanho 05	10	-	-	-	1	-	-	-	-
Laranjeira do Sul/ rebanho 06	06	1	-	-	-	-	-	-	-
Curitiba									
Campina grande do Sul/ rebanho 07	32	29	1	5	-	5	5	5	1
Adrianópolis/ rebanho 08	08	8	-	-	-	8	2	-	-
Adrianópolis/ rebanho 09	05	5	-	-	-	-	-	-	-
Morretes/ rebanho 10	23	20	-	4	5	3	-	-	-
Cerro Azul/ rebanho 11	18	11	-	-	2	7	2	-	-
Cerro Azul/ rebanho 12	11	9	-	1	1	-	4	2	-
Rio Branco do Sul/ rebanho 13	30	27	-	1	5	15	6	2	-
Rio Branco do Sul/ rebanho 14	21	19	-	1	2	-	3	-	-
Rio Branco do Sul/ rebanho 15	22	21	1	15	5	2	9	7	-
Campo Largo/ rebanho 16	7	7	1	7	4	1	3	1	-
Norte Central									
Uniflor/ rebanho 17	11	9	-	1	2	-	2	-	-
Norte Pioneiro									
Pinhalão/ rebanho 18	07	-	-	-	-	-	-	-	-
Japira/ rebanho 19	04	-	-	-	-	-	-	-	-

Ibati/ rebanho 20	08	-	-	-	-	-	-	-	-
Nordeste									
São Mateus do Sul/ rebanho 21	14	8	-	1	1	1	2	-	-
Teixeira Soares/ rebanho 22	06	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	296	206	3	52	30	53	39	22	2

FONTE: O autor, 2022.

(-) Não houve animais reagentes.

5.4 DISCUSSÃO

Leptospirose em búfalos foi reportada em diversos países por meio de estudos sorológicos que demonstraram diferentes prevalências (KONRAD et al., 2013; ALAMURI et al., 2019; OLMO et al., 2018; GUEDES et al., 2020a). Diversas pesquisas determinaram a prevalência da leptospirose no Brasil e no mundo, que varia de 2,3% no Lao a 67,18% na Índia (OLMO et al., 2018; ALAMURI et al., 2019). No Brasil, a frequência de bubalinos soropositivos para leptospirose varia de 2,4% a 91,5% nas pesquisas mais recentes (GUEDES et al., 2020a; LEAL, 2015).

A soroprevalência de leptospirose em búfalos no estado do Paraná encontrada no presente estudo foi de 75,67%, resultado elevado próximo a 80% de Viana e colaboradores (2009) no Pará e de 70,58% encontrado por Carvalho e colaboradores (2015) no Maranhão. A soroprevalência encontrada foi maior que as encontradas nos demais trabalhos realizados em diferentes estados do Brasil, como por exemplo, 28,5% em Permanbuco (OLIVEIRA et al., 2018), 27,9% na Paraíba (PIMENTA et al., 2019), 67,7% em búfalos no Pará (SILVA et al., 2009) ou 56,25% em Minas Gerais (MENDES et al., 2018). É importante considerar também que a soroprevalência para leptospirose pode ser afetada pelo número de sorovares utilizados nos testes de SAM (ADESYUN et al., 2009).

O sorovar com maior prevalência nos bubalinos testados neste estudo foi o *Icterohaemorrhagiae*, cuja prevalência de animais soropositivos foi de

69,59% (206/296). Este resultado foi considerado elevado quando comparado com a prevalência do sorovar Icterohaemorrhagiae de outros trabalhos de soroprevalência de leptospirose em búfalos no Brasil, onde a prevalência foi de 24,5% no Maranhão (CARVALHO et al., 2015), 33,6% em São Paulo (LANGONI et al., 1999) e 5% na cidade de Belém (ROCHA et al., 2019). Em outros países como na Índia (21,38%) (ALAMURI et al., 2019), na Tanzânia (5,26%) (ASSENGA et al., 2015), na Turquia (1,07%) (KENAR; OZDEMIR, 2013) ou no Irã (8,1%) (MOHAMMAD et al., 2014) a prevalência do sorovar Icterohaemorrhagiae também foi menor que a obtida no presente estudo.

Os principais hospedeiros ou reservatórios do sorovar Icterohaemorrhagiae são os roedores, o que sugere que estes tenham um papel fundamental na transmissão da leptospirose aos bubalinos utilizados no presente estudo (CAMPOS et al., 2017). Isso levanta a hipótese de que roedores possuem acesso principalmente ao alimento oferecido aos búfalos, mas também de que estes podem estar contaminando as áreas de banhados ou o ambiente em que estes búfalos convivem, principalmente se for em locais próximos ao meio urbano ou de má condição sanitária.

O sorovar Hardjo foi o segundo sorovar de maior prevalência nos bubalinos do estado do Paraná, com 17,90% (53/296) de animais sororreagentes. Este é considerado em diferentes estudos como o sorovar mais frequentemente encontrado em rebanhos bubalinos no Brasil, com prevalências de 41,2% no Amazonas (GUEDES et al., 2020a), 43,4% e 33,6% em São Paulo (FAVERO et al., 2002; LANGONI et al., 1999), 15,75% e 65,2% no Pará (SILVA et al., 2009; DIAS et al., 2014), 43,2% no Pernambuco (OLIVEIRA et al., 2018), e 20,4% na Ilha do Marajó (OLIVEIRA et al., 2013). Desta forma, a prevalência do sorovar Hardjo em bubalinos provenientes do estado do Paraná pode ser considerada menor que em outros estados e regiões do Brasil.

A alta prevalência do sorovar Hardjo em búfalos pode ser relacionada à sua similaridade aos bovinos, considerado hospedeiro de manutenção deste sorovar (CHIARELI ET AL., 2012; CHIDEROLI ET AL., 2016). Nestes animais a doença se desenvolve na forma crônica e subclínica, onde os animais

persistem transmitindo a doença por meio da urina e secreções do trato reprodutivo (MARTINS; LILENBAUM, 2014). A infecção dos bubalinos pode ser associada a sua proximidade e alta interação com os bovinos, tornando-os também reservatórios deste sorovar (OLIVEIRA et al., 2018; ASSENGA et al., 2015; GUEDES et al., 2020b).

O terceiro sorovar mais encontrado em búfalos provenientes do estado do Paraná foi o sorovar Pomona, com 17,56% de prevalência. Este sorovar também é relatado infectando búfalos no Brasil, e trabalhos demonstram prevalências de 29,41% no Maranhão (CARVALHO et al., 2015), 16,3% no Amazonas (GUEDES et al., 2020a), 31,6% e 8,82% na Paraíba (PIMENTA et al., 2019; LIMA BRASIL et al., 2015). O sorovar Pomona tem como hospedeiro principal o suíno (FAINE et al., 1999; PIMENTA et al., 2019), o que sugere que os bubalinos infectados possam ter contato com suínos, sendo estes a sua fonte de transmissão.

Quando se compara as propriedades, pode-se observar que 81,82% (18/22) das propriedades onde amostras de parte do rebanho foram coletadas tiveram pelo menos um animal sororreagente à *Leptospira* spp.. Destaca-se que as três propriedades da mesorregião Norte Pioneiro não tiveram casos de animais positivos para leptospirose, o que pode sugerir que a prevalência na respectiva região é menor que em outras regiões como a região Centro Oriental ou de Curitiba, por exemplo.

Ressalta-se que este é o primeiro trabalho na literatura avaliando a prevalência da leptospirose em búfalos no Paraná, por isso pouco sabe-se sobre a situação epidemiológica dos bubalinos do neste estado com relação à enfermidade até o presente momento. Em bovinos um trabalho realizado por Hashimoto et al., (2012) determinou que a prevalência da leptospirose em bovinos com aptidão para corte e leite provenientes do Paraná foi de 34,41%, índice menor que o encontrado para bubalinos no presente trabalho.

A alta prevalência encontrada neste estudo demonstra que a leptospirose está presente infectando búfalos no estado do Paraná, Brasil. A prevalência elevada pode ser relacionada ao manejo, condições ambientais, status sanitário do rebanho, ausência de vacinação e de diagnóstico ou

controle rotineiro, e não realização de tratamento ou descarte dos animais soropositivos (HIGINO et al., 2012). Ademais, a exposição dos animais a outras espécies de animais silvestres e roedores é um fator predisponente na epidemiologia da leptospirose (LINHARES et al., 2005). Isso demanda atenção com relação à saúde pública, uma vez que estes animais são utilizados como fonte de carne e leite (GUEDES et al., 2020a).

Por este motivo seria importante a inclusão da leptospirose em programas de vigilância, assim como a promoção da vacinação dos rebanhos e demais estratégias para controlar a prevalência da enfermidade em rebanhos bubalinos e demais animais e produção (ALAMURI et al., 2019). É importante que seja realizada a identificação dos sorovares circulantes em determinada região para que se elabore uma estratégia de controle regional para a leptospirose (ELLIS, 2015). Recomenda-se também a vacinação dos rebanhos para os sorovares presentes na região, assim como o uso de biotecnologia da reprodução para evitar a transmissão venérea da enfermidade (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020).

Destaca-se também a importância do controle da população de roedores, principalmente em locais passíveis de alagamentos ou inundações (CHADSUTHI et al., 2018; NARDI JUNIOR et al., 2010). Recomenda-se dar atenção especial à fonte de água dos animais, pois esta possui um papel importante na transmissão da leptospirose (SAITO et al., 2013; NARDI JUNIOR et al., 2010), assim como evitar a criação conjunta de diferentes espécies e a alta densidade animal em uma mesma área (PAIXÃO et al., 2016). Por fim, é indicado também o isolamento e tratamento dos animais soropositivos (LEVETT, 2001).

5.5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho que determina a prevalência da leptospirose em bubalinos provenientes do estado do Paraná e seus respectivos sorovares. Conclui-se que a prevalência de bubalinos com leptospirose no Paraná é

considerada elevada. Observou-se que os principais sorovares circulando nesta população são Icterohaemorrhagiae, Hardjo e Pomona, o que sugere o contato destes búfalos com roedores, suínos e outros animais silvestres. Medidas de controle e prevenção são necessárias para prevenir a transmissão da leptospirose em rebanhos bubalinos, assim como para seres humanos e outras espécies de animais no estado do Paraná, uma vez que trata-se de uma questão de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ADESIYUN, A.A., et al., Leptospirosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Vet. Arhiv**, v.79, p.77–86, 2009. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/med-17784>. Acesso em: abril 2021.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. de la P. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.** v.140, n.3, p.287–96, 2010.
- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 172, n. 3-4, p. 353-461, 2014. DOI: 10.1016/j.
- ALAMURI, A., et al. Seroprevalence and distribution of serogroup-specific pathogenic *Leptospira* antibodies in cattle and buffaloes in the state of Andhra Pradesh, India. **Vet. World**, v.12, n.8, p.1212-1217, 2019. Doi: 10.14202/vetworld.2019.1212-1217
- ASSENGA, J.A., et al. Predominant Leptospiral Serogroups Circulating among Humans, Livestock and Wildlife in Katavi-Rukwa Ecosystem, Tanzania. **PLoS Negl Trop Dis**. v.9, n.3, p. 1-14, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003607
- BALAMURUGAN, V., et al. Investigation on the Distribution of *Leptospira* Serovars and its Prevalence in Bovine in Konkan Region, Maharashtra, India. **Adv. Anim. Vet. Sci.** v.4, n.2, p.19-26, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.2s.19.26>
- CAMPOS, A. P. et al. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 49, n. 5, p. 899-907, 2017. DOI: 10.1007/s11250-017- 1255-2
- CARVALHO, O.S., et al. Occurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. **African J. Microbiol. Res.** v.9, n.9, p.598-603, mar. 2015.

- CASTRO, V. et al. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.75, n.1, p.3-11, jan./mar.- 2008.
- CHADSUTHI, S., et al. A remotely sensed flooding indicator associated with cattle and buffalo leptospirosis cases in Thailand 2011–2013. **BMC Infectious Dis.** v.18, n.602, p.1-9, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3537-3>
- CHADSUTHI, S., et al. Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and livestock in Thailand, 2010-2015. **PLoS Negl Trop Dis.** v.11, n.2, p. 1-18, 2017. doi:10.1371/journal.pntd.0005228
- CHIARELI, D., et al. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 7, p. 633-639, 2012.
- CHIDEROLI, R.T., et al. Culture strategies for isolation of fastidious *Leptospira* serovar Hardjo and molecular differentiation of genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. **Front Microbiol.** v.8, n.2155, p.1-8, 2017.
- CONTRERAS, A.M.; FIGUEREDO, G.M.; CARRILLO, A.C. Actualización de la Neosporosis bovina. **Conexión Agropecuaria.** v.2, n.1, p.49-66, 2012.
- DENIPITIYA, D.T.H., et al. Identification of cattle, buffaloes and rodents as reservoir animals of *Leptospira* in the District of Gampaha, Sri Lanka. **BMC Res Notes.** v.10, n.134, p. 1-5, 2017.
- DIAS, H.L.T., et al. A serological survey to determine the commonly occurring serovars of *Leptospira* sp.in herds buffaloes in the Para State, Brazil. **IV Conf. Nac. sobre Defesa Agropecuária: Defesa Agropecuária e Sustentabilidade.** Belém, Pará, Brazil, 2014.
- ELLIS, W.A. Animal leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol.** v.387, p.99-137, 2015. DOI 10.1007/978-3-662-45059-8_6
- FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis.** 2th ed. Melbourne: MediSci Press, 1999. 272 p.

FAVERO, A.C.M., et al. Sorovares de leptospiros predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.613-619, 2002.

FELT, S.A., et al. Cross-Species Surveillance of *Leptospira* in Domestic and Peri-Domestic Animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.84, n.3, p. 420–425, 2011. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0393

GALIERO, G. Causes of infectious abortion in the mediterranean buffalo. **Ital. J. Anim. Sci.** v.6, p.194–199, 2007. doi: 10.4081/ijas.2007.s2.194

GIRALDO, J.L.M., et al. Prevalencia de anticuerpos a *Brucella abortus*, *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* en hatos bovinos y bubalinos en el Departamento de Caquetá, Colombia **Rev. Salud Anim.** v.36, n. 2, p.80-89, 2014.

GUEDES, I.B., et al. Identification of Pathogenic *Leptospira* Species in the Urogenital Tract of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) From the Amazon River Delta Region, Brazil. **Front. Vet. Sci.** v.7, n.269, p.1-7, 2020a. doi: 10.3389/fvets.2020.00269

GUEDES, I.B., et al. Prevalence of *Leptospira* serogroups in buffaloes from the Brazilian Amazon. **Vet. Med. Sci.** v.6, p.433–440, 2020b. DOI: 10.1002/vms3.271

HAJIKOLAEI, M.R. et al. Seroprevalence Of Leptospiral Infection In Buffalo (*Bubalus Bubalis*). **Bull Vet Inst Pulawy.** v.50, p.341-344, 2006.

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

HASSANPOUR, A.; MOUSAVI, G.H. A case report of leptospira grippotyphosa in the Azerbaijan buffalo in Iran. **Ital. J. Anim. Sci.** v. 6, n.2, p. 893-895, 2007.

HIGINO, S. S. S. et al. Prevalência de leptospirose em caprinos leiteiros do semiárido paraibano. **Pesq. Vet. Bras.**. Seropédica, v. 32, n. 3, p. 199-203, 2012.

IJAZ, M., et al. Seroprevalence of leptospirosis and its association with reproductive and productive parameters from buffalo population of Rajanpur and Muzaffargarh districts of Pakistan. **J. Anim. Plant Sci.** v.30, n.1, p. 1-7, 2020.

KENAR, B.; OZDEMIR, V. The seroprevalence of Leptospirosis in Anatolian buffaloes in Turkey. **Rev Med Vet.** v.164, n.6, p.331–335, 2013. DOI 10.1007/s11250-013-0427-y

KONRAD, J.L., et al. Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., and Apicomplexa protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina. **Trop. Anim. Health Prod.**, p.1-6, 2013. DOI 10.1007/s11250-013-0427-y

LANGONI, H., et al. Aglutininas antileptospíricas em búfalos do vale do ribeira, estado de São Paulo. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 29, n. 2, p. 305-307, 1999.

LEAL, M.A.C. **Determinação de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Bioma Amazônico Paraense**. Dissertação (Mestre em Ciência Animal), Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev** v.14, p.296 – 326, 2001.

LEVETT, P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis. **Clin Appl Immunol Rev.** v.4, p.435–448, 2004.

LIMA BRASIL, A. W., et al. Occurrence of anti-*Brucella abortus* and anti-*Leptospira* spp. antibodies in buffaloes from Paraíba state, Northeastern Brazil **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p.2005-2012, 2015.

LINHARES, G.F.C., et al. Sorovares de *Leptospira interrogans* e respectivas prevalências em cavalos da microrregião de Goiânia, GO. **Ciê. Anim. Bras.**

v.6, p.255–259, 2005. <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/376/351>

Acesso em: jul 2020

LOUREIRO, A.P.; LILENBAUM, W. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. **Theriogenology**. v.141, p.41-47, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>

MARIANELLI, C., et al. Molecular detection of *Leptospira* species in aborted fetuses of water buffalo. **Vet Rec**. v.161. p.310–311, 2007. doi:

10.1136/vr.161.9.310

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. **Transb. Emerg. Dis.**, New York, v.

61, n. 1, p. 63-71, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12233>

MENDES, A.F.et al. Ocorrência de animais com anticorpos anti-*Leptospira* spp. na região de Uberlândia, MG, 2011-2014. **Rev. Agropecuária Técnica**, v. 39, n. 3, p. 270-276, 2018. DOI: 10.25066/agrotec.v39i3.40383

MILLER, D.A.; WILSON, M.A.; BERAN, G.W. Relationship between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic, and seasonal factors. **Am. J. Vet. Res.** v.52, p.176-1768, 1991.

MOHAMMAD, T. Prevalence of Serum Antibodies against Six *Leptospira* Serovars in Buffaloes in Tabriz, Northwestern Iran. **J. Buffalo Sci.** v.3, p.76-81, 2014.

NARDI JUNIOR, G., et al. An in vitro growth inhibition test for measuring the potency of *Leptospira* spp. Sejroe group vaccine in buffaloes. **Biologicals** (London. Print), v. 38, p. 474-478, 2010.

NARDI JUNIOR, G., et al. Interferência de anticorpos vacinais no diagnóstico sorológico da leptospirose em bubalinas vacinadas. **VII Simp. de Ciências da Unesp – Dracena**. Dracena, out. 2011.

OLIVEIRA, G.C., et al. Pesquisa de anticorpos anti-leptospíricos em bubalino. **Ars Vet.** p.29-33, 2013. doi: 10.15361/2175-0106.2013v29n4p33

OLIVEIRA, P.R.F.D., et al. Occurrence of serological reactions for serogroup Sejroe (CTG and Prajino) in female buffalo in the state of Pernambuco, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v.49, p.795–800, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.007>

OLMO, L., et al. Investigation of infectious reproductive pathogens of large ruminants: Are neosporosis, brucellosis, leptospirosis and BVDV of relevance in Lao PDR. **Acta Tropica**, v.177, p.118–126, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220335>

PAIXÃO, A.P., et al. *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes. **Arq. Inst. Biol.**, v.83, p.1-12, 2016. DOI: 10.1590/1808-1657001022014

PIMENTA, C. L. R. M., et al. Seroprevalence and predominant serogroups of *Leptospira* sp. in serological tests of ruminants in northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, p.1512–1522, 2019. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1513>

ROCHA, K.S., et al. Detecção de anticorpo anti-Brucella sp. e anti- *Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) abatidos em matadouro na cidade de Belém, Pará. **Rev. Ciências Agrárias**. p.62:4, 2019. <http://dx.doi.org/10.22491/rca.2019.3046>

SAITO, M., et al. Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. **Appl. Environ. Microbiol.** v.79, n.2, p.601–609, 2013. doi:10.1128/AEM.02728-12

SILVA, G.R., et al. Distribuição de anticorpos para *Leptospira* sp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) da região nordeste do estado do Pará, Brasil. **Ciência Animal Brasileira** – Suplemento 1, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.

VIANA, R.B., et al. Ocorrência de anticorpos anti- *Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *leptospira* spp. em búfalos (*bubalus bubalis*) criados na amazônia. **Arq. Inst. Biol.** v.76, p.453–457, 2009. doi: 10.13140/2.1.1966.1446

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 Organisation). Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. ISBN 978 92 4 150152 1. Printed by the **WHO** Document Production Services, Geneva, Switzerland. p.7-14, 2011.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo é o primeiro a investigar e determinar a prevalência da hemoplasmosse e leptospirose em rebanhos bubalinos de diferentes mesorregiões do estado do Paraná. Os resultados encontrados são de suma importância para a tomada de medidas de controle e prevenção destas enfermidades nos rebanhos bubalinos do estado. Estas medidas são necessárias tanto para mitigar o impacto econômico causado na cadeia de produção da bubalinocultura, quanto para adotar medidas de saúde pública para proteção da população, principalmente com relação à leptospirose.



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 043/2020, referente ao projeto de pesquisa **“Diagnóstico e prevalência de hemoplasmas e vírus da leucemia bovina em bubalinos no estado do Paraná”**, sob a responsabilidade de **Ivan Roque de Barros Filho** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em 02/10/2020.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	Novembro/2020 até Fevereiro/2021
Espécie/Linhagem	<i>Bubalus</i> spp. (bubalino)
Número de animais	375
Peso/Idade	400 kg/Variável
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Fazendas comerciais no estado do Paraná, Brasil.

*A autorização para início da pesquisa se torna válida a partir da data de emissão deste certificado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 043/2020, regarding the research project **“Diagnostic and prevalence of hemoplasmas and bovine leukemia virus in buffaloes in Paraná state, Brazil”** under **Ivan Roque de Barros Filho** – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 10/02/2020.

Purpose	Research
Validity	November/2020 until February/2021
Specie/Line	<i>Bubalus</i> spp. (bubaline)
Number of animals	375
Weight/Age	400 kg/Variable
Sex	Male and female
Origin	Commercial farms in Paraná state, Brazil.

*The authorization to start the research becomes valid from the date of issue of this certificate.

Curitiba, 20 de outubro de 2020

Simone Tostes de Oliveira Stedile
Coordenadora CEUA-SCA

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias - UFPR