



Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos

CYNTHIA ESCÓCIO FERNANDES

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade animal
Orientador(a): Margareth Elide Genovez

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca

Instituto Biológico

Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Fernandes, Cynthia Escócio

Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira spp.* sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos. / Cynthia Escócio Fernandes. – São Paulo, 2009.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade animal.

Linha de pesquisa: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Margareth Elide Genovez

Versão do título para o inglês: Sheep role in epidemiological chain of *Leptospira spp.* serovar Hardjo: risk factors involving the infection and the transmission between sheep and cattle.

1. Leptospirose 2. *Leptospira spp.* sorovar Hardjo 3. ovino 4. bovino 5. pastoreio consorciado

I.Genovez, Margareth Elide II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

CYNTHIA ESCÓCIO FERNANDES

Título: Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos

Orientador(a): Margareth Elide Genovez

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade animal

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Margareth Elide Genovez
Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Silvio Arruda Vasconcellos
Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Rosa Maria Piatti
Instituição: Instituto Biológico

Dedicatória

À minha querida família
pelo amor e crença no meu potencial
e pelo incentivo às minhas escolhas.

Agradecimentos

A Deus, pela minha vida maravilhosa e saúde perfeita e por me dotar de capacidade infinita para a realização deste projeto.

À Profa. Dra. Margareth Elide Genovez, por ter-me escolhido ser sua orientada na pós-graduação do Instituto Biológico, pela paciência, carinho, pelos ensinamentos que me ajudaram a dar o melhor de mim nesse trabalho.

À Vanessa Castro, amiga e professora que me ajudou em todo o trabalho na rotina do laboratório, tem a minha grande admiração.

À Dra. Lília Paulin, por ser a alegria no laboratório, por ter sido um ombro amigo e por me fazer dar grandes gargalhadas em momentos de descontração.

À Dra. Rosa Piatti pelo carinho, pela realização da PCR do trabalho e por ser ter sido minha amiga neste período.

À Dra. Eliana Scarcelli pela ajuda nas questões burocráticas de projeto e pós-graduação e também pela Dra. Maristela Cardoso pela companhia no laboratório e amizade.

À Maria e Maria Antera pelo carinho e todo o suporte no laboratório para o trabalho que pude realizar.

Aos pesquisadores e amigos Daniela Chiebao e Fábio Gabriel do Pólo Regional APTA - Sorocaba e a Paulo Tomazella, médico veterinário da Casa da Agricultura do município de Piedade-SP, pela realização do projeto nos primeiros momentos de sua execução, como contatos com as propriedades, colheita de amostras e exames parasitários.

Ao Dr. Sidney Vieira e Dr. Márcio Chiba do Instituto Agrônomo de Campinas, pelas análises granulométricas e pela realização da permeabilidade do solo nas propriedades.

Ao Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução, Laboratório de Viroses dos Bovídeos, Laboratório de Raiva e Encefalites do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, São Paulo pela realização dos outros exames complementares deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo, da Universidade Federal de Campina Grande, pelos resultados estatísticos deste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação pelos momentos de descontração e apoio, principalmente a Aline Feola pela grande amizade e estima e por ter estado ao meu lado em vários momentos durante o mestrado.

A João Simione, motorista oficial deste trabalho.

A todos os funcionários do Instituto Biológico que, de uma forma direta ou indireta puderam colaborar no andamento deste trabalho.

A todos os proprietários da região de Sorocaba, que permitiram a entrada da nossa equipe em suas propriedades e analisar seus animais, como também a estes por existirem e serem o ponto crucial de nosso estudo.

À Ilana Teruszkin Balassiano do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) pela tentativa da realização da identificação do isolado.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Epígrafe

*“O olho que perscruta e desseca
pode conviver harmoniosamente
com o que contempla e venera “.*
(Anônimo)

RESUMO

ESCOCIO, C.F.; **Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos.** Sheep role in epidemiological chain of *Leptospira* spp. serovar Hardjo: risk factors involving the infection and the transmission between sheep and cattle. São Paulo, 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental do Agronegócio). Instituto Biológico.

Evoluindo de criações de subsistência, a ovinocultura brasileira apresenta grande potencial de crescimento. Entretanto certas deficiências sanitárias devem ser resolvidas, tais como a leptospirose que causa problemas reprodutivos. Um dos fatores de risco relacionados à infecção pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo parece ser a criação consorciada de bovinos e ovinos. Com este estudo, objetivou-se caracterizar o papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose causada pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo, identificando os fatores de risco que envolvem a infecção e a transmissão entre ovinos e bovinos. Um questionário epidemiológico foi aplicado à oito propriedades da região de Sorocaba-SP: cinco de criações consorciadas ovinos e bovinos e três exclusivas de ovinos. Amostras sorológicas foram colhidas de 10% dos animais adultos e submetidas a soroaglutinação microscópica (SAM) para leptospirose. Quatro destas criações que apresentavam animais reagentes para *Leptospira* spp. foram selecionadas: ovinos (A e C) e consorciadas (F e H), colhendo-se: amostras sorológicas de 100% dos animais adultos e analisadas na SAM, 10% de amostras de urina e cultivadas para leptospiros e nove *pools* de urinas submetidas a PCR. Amostras de águas de superfície e solo foram cultivadas nas mesmas condições das urinas. Foram analisadas as condições edafoclimáticas da região e as características do solo das propriedades como pH, permeabilidade, granulometria e teor de matéria orgânica (amostras de Abril e Setembro de 2008). Todos os rebanhos apresentaram pelo menos um animal reagente para leptospirose, sendo reagentes 51,16% (22/43) dos animais consorciados e 70,83% (17/24) dos exclusivos ($p= 0,191$). Nenhum rebanho exclusivo de ovinos (A e C) apresentou reagentes para o sorovar Hardjo, apenas os consorciados (F e H). A condição consorciada do rebanho foi significativa para o sorovar Hardjo ($p= 0,018$). Quando avaliado o total de ovinos em condições criatórias exclusivas frente aos consorciados com bovinos, o risco associado à consorciação das espécies do total dos animais foi significativa para a presença deste sorovar ($p=0,005$). Os demais fatores não mostraram significância estatística. De todos os exames bacteriológicos para isolamento e identificação de *Leptospira* spp., apenas uma amostra de água de superfície

da propriedade F foi positiva. Pela PCR, apenas o *pool* de urina ovina do rebanho H confirmou a presença de DNA de *Leptospira* spp. As condições edafoclimáticas apontam para uma região quente e úmida praticamente constante. Permeabilidade, pH e teor de matéria orgânica e de micronutrientes dos solos mostraram pequenas diferenças entre as propriedades, mas todas condizentes com a condição necessária à manutenção de leptospiros. Na granulometria, os solos apresentaram textura mista: A e F do tipo franco-argilosa, H do tipo franco-siltosa e C do tipo argilosa. A sobrevivência de leptospiros estaria relacionada ao efeito sinérgico ou antagônico da interação de todos esses fatores e da concentração deste agente excretada na urina dos animais infectados. A infecção de *Leptospira* spp. sorovar Hardjo em ovinos está diretamente envolvida com o pastejo consorciado com bovinos, independentemente da existência de outros fatores de risco. Condições ambientais são importantes para sobrevivência de leptospiros, entretanto a umidade é limitante para a manutenção do ciclo de transmissão.

Palavras-chave: Leptospirose, *Leptospira* spp. sorovar Hardjo, ovino, bovino, pastoreio consorciado

ABSTRACT

ESCOCIO, C.F.; **Sheep role in epidemiological chain of *Leptospira* spp. serovar Hardjo: risk factors involving the infection and the transmission between sheep and cattle.** Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos. São Paulo, 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental do Agronegócio). Instituto Biológico.

Brazilian sheep breeding has evolved from a subsistence activity to one of great economic potential. However, some sanitary deficiencies have to be solved, such as leptospirosis which causes reproductive problems. One of the risk factors for infection by *Leptospira* spp. serovar Hardjo is raising cattle and sheep together. The objective of this study was to determine the role of sheep in the epidemiological chain of leptospirosis caused by serovar Hardjo, identifying risk factors related involving the infection and the transmission between sheep and cattle. An epidemiological questionnaire was applied to eight farms around Sorocaba-SP: five farms where cattle and sheep were raised together, and three farms where only sheep were raised. Serum samples of 10% of the adult animals from these eight herds were submitted to microscopic seroagglutination (MAT) for leptospirosis. Four farms presenting reactors to leptospirosis: two sheep-only farms (A and C) and two cattle-sheep farms (F and H) were chosen and serum samples were collected from 100% of the adult animals and analyzed using MAT. Urine samples of 10% of these animals, as well as samples of surface water and soil were cultured for leptospires, and nine urine pools were analyzed by PCR. Regional edaphoclimatic conditions of the farms as well as pH, granulometry and permeability of soil were analyzed (soil sampled in April and September 2008). All herds showed at least one reactor to leptospirosis. From the samples collected in the herds, 51.16% (22/43) of the animals raised in cattle-sheep farms and 70.83% (17/24) of the animals raised in sheep-only farms were reactors ($p= 0.191$). Only cattle-sheep farms (F and H) showed reactors to serovar Hardjo. Raising animals together was considered to be a significant risk factor for serovar Hardjo ($p= 0.018$). The comparison between the total number of sheep raised alone and the total number of sheep raised with cattle showed that keeping the species together was a significant risk factor for the presence of this serovar ($p=0.005$). No other factor analyzed showed to be statistically significant. No urine sample showed growth of *Leptospira* spp. One sample of surface water from farm F yielded the isolation of *Leptospira* spp. PCR demonstrated the presence of *Leptospira* spp. DNA in a pool of urine in herd H. The edaphoclimatic condition indices showed that in the region, no matter the season, were almost hot and humid constant. Soil permeability, pH and organic

matter showed minimal differences, but all with conditions for leptospire maintenance of leptospire in the environment. Granulometry in farms A and F showed loamy-clay texture; farm C had clay soil, and farm H, loamy-silt soil. It was concluded that serovar Hardjo in sheep was directly related to the presence of cattle, no matter the presence of other risk factors. Cattle seemed to be responsible for the maintenance of this serovar in the environment of the farms, as well as for the transmission to sheep. Although edaphoclimatic conditions are important for the survival of leptospire in the environment, humidity is limiting for the maintenance of the transmission cycle.

Key-words: Leptospirosis, *Leptospira* spp. serovar Hardjo, sheep, cattle, consorciated pasture.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
μ	micra
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
APTA	Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio
ATB	antibiótico
BVDV	pestivírus (Vírus da Diarréia Viral Bovina)
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CATI	Coordenadoria de Assistência Técnica Integral
CIIAGRO	Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas
cm	centímetro
DNA	ácido desoxirribonucléico
Dr.	Doutor
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DTPA-TEA	ácido dietileno-triaminopentacético e trietanolamina
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
<i>et al</i>	e colaboradores
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
H ⁺	íon hidrogênio
ha	hectares
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KCl	cloreto de potássio
Kg	kilograma
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
Lep	oligonucleotídeo iniciador
LO4	estirpe de <i>Leptospira</i> spp. sorovar Canicola
LUPA	Levantamento Censitário das Unidades Produtoras Agropecuárias
M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	milímetro

mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetros
°C	Graus Celsius
OPG	Contagem de ovos por grama de fezes
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose
rpm	rotações por minuto
SAM	Reação de Soroaglutinação Microscópica
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TFSA	Terra Fina Seca ao Ar
TRIS	hidroximetil-aminometano
UPAS	Unidades Produtoras Agropecuárias
UPD	Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento
WHO	World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Identificação das propriedades analisadas na região de Sorocaba, respectivos sistemas de criação e número de animais examinados relativos a duas fases de colheita de amostras. São Paulo – 2008	20
Tabela 2-	Presença de leptospirose investigada nos rebanho de criação exclusiva de ovino ou consorciada com bovino da região de Sorocaba – São Paulo – 2008	31
Tabela 3-	Freqüência de rebanhos reagentes e o total de animais examinados para leptospirose em condições criatórias exclusivas de ovinos e consorciadas com bovinos da região de Sorocaba. São Paulo – 2008	32
Tabela 4-	Fatores de risco associados à presença de animais sororeagentes para o sorovar Hardjo para os rebanhos de criação exclusiva de ovino ou consorciados com bovino da região de Sorocaba – São Paulo – 2008	33
Tabela 5-	Soroprevalência para leptospirose nos rebanhos A, C, F e H da região de Sorocaba - São Paulo – 2008	36
Tabela 6-	Cultivos de amostras ambientais (águas de superfície e solo) das propriedades A, C, F e H da região de Sorocaba – São Paulo – 2008	37
Tabela 7-	Observações termo-pluviométrica da cidade de Piedade – SP. São Paulo – 2008	39
Tabela 8-	Valores de pH de águas superfície colhidas nas propriedades A, C, F e H da região de Sorocaba - São Paulo – 2008	40
Tabela 9-	Análise do índice de matéria orgânica, nutrientes e pH do sdo nas propriedades A, C, F e H da região de Sorocaba - São Paulo – 2008.....	41
Tabela 10-	Índices de infiltração (permeabilidade) nas propriedades selecionadas na época das chuvas (abril) e estiagem (setembro). São Paulo – 2008	42
Tabela 11-	Análise granulométrica das amostras de solo das propriedades e seu tipo predominante de textura do solo. São Paulo - 2008	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aplicação da técnica de PCR da estirpe isolada de águas de superfície da propriedade F. São Paulo - 2008	38
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Leptospiras empregadas como antígenos na Reação de <u>S</u> oroaglutinação Microscópica (SAM), relação de espécies, sorogrupos e sorovares. São Paulo – 2008	24
-----------	--	----

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO LITERÁRIA	4
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Seleção dos rebanhos para formação dos grupos	19
4.2. Animais	21
4.3. Colheita de amostras clínicas	21
4.3.1. Soro	21
4.3.2. Urina	21
4.4. Colheita de amostras ambientais	22
4.4.1. Águas de superfície e de bebida	22
4.4.2. Amostras de Solo	22
4.5. Exames laboratoriais das amostras clínicas	23
4.5.1. Soroaglutinação microscópica para leptospirose	23
4.5.1.1. Antígenos	24
4.5.1.2. Triagem, titulação dos soros e interpretação de resultados	25
4.5.2. Isolamento e identificação de <i>Leptospira</i> spp.	25
4.5.3. Detecção de DNA de <i>Leptospira</i> spp. utilizando PCR em amostras de urina	26
4.5.3.1. Extração de DNA	26
4.5.3.2. Reação da polimerase em cadeia (PCR)	27
4.5.3.3. Análise do produto amplificado	27
4.6. Exames laboratoriais das amostras ambientais	28
4.6.1. Cultivo de águas de superfície e de bebida para <i>Leptospira</i> spp.	28
4.6.2. Cultivo de amostras de solo para <i>Leptospira</i> spp.	28
4.6.3. Exames de permeabilidade, granulometria, índice de matéria orgânica, nutrientes e pH de solo	28

4.7.	Dados climatológicos da região	29
4.8.	Aplicação do questionário epidemiológico	30
4.9.	Tratamento dos dados	30
5.	RESULTADOS	31
6.	DISCUSSÃO	45
7.	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
	ANEXO	70
	APENDICE	75

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é um dos segmentos da pecuária nacional com grande potencial de crescimento e interesse por parte dos pecuaristas por não demandar grandes extensões de terra. Evoluindo de criações voltadas para a subsistência, nos últimos dez anos ocorreram mudanças significativas para a consolidação da cadeia produtiva da ovinocaprinocultura no Brasil. Neste período, a atividade despertou maior atenção de governantes, técnicos e produtores, acarretando mudanças significativas onde se destacam a intensificação da pesquisa voltada para produção de animais e o beneficiamento de seus produtos, a melhoria do nível de organização da cadeia produtiva, a absorção de novas tecnologias, a maior atenção dos agentes financeiros para facilitar o acesso ao crédito e, o mais importante, o aumento da demanda de consumo por produtos derivados de caprinos e ovinos (MEDEIROS, SANO, RIBEIRO, 2005; CARVALHO, 2007). Entretanto, apesar deste impulso mercadológico, a produtividade da ovinocaprinocultura de corte no Brasil ainda é baixa.

Uma das razões está no regime de manejo de exploração predominantemente extensiva e rudimentar, com alta dependência da vegetação nativa, utilização de raças não especializadas, assistência técnica deficitária, baixo nível de organização e de gestão da unidade produtiva e, sobretudo a carência de controle sanitário efetivo.

Diferentemente da região Nordeste, cujo consumo se caracteriza pelo produto sem qualquer controle sanitário, a carne de caprino e ovino das regiões Sul e Sudeste atende aos consumidores de classes A e B, muito bem informados e atentos ao processo de produção (MEDEIROS, SANO, RIBEIRO, 2005; CARVALHO, 2007). Desta forma, este mercado vem exigindo maior preocupação sanitária, por meio de medidas de biossegurança e de exames diagnósticos para que gerem maiores índices produtivos, principalmente no que se refere às enfermidades que acometem o sistema reprodutivo, principais responsáveis pelos prejuízos econômicos, onde se destaca a leptospirose.

Enfermidade mundialmente distribuída, a leptospirose é particularmente prevalente nas Américas e considerada endêmica na América Latina e no Caribe, com impacto na economia agropecuária. A ocorrência de leptospirose está estreitamente vinculada aos fatores ambientais, que podem dar lugar a um foco de infecção, cuja amplitude está na dependência de condições favoráveis, das características do “habitat” e da presença de animais silvestres (ALVES *et al.*, 1996; GENOVEZ, 2006c).

Teoricamente qualquer sorovar de *Leptospira* spp. pode infectar qualquer espécie animal, mas na prática um número limitado de sorovares é endêmico em uma região ou país em particular. Neste caso, a infecção é determinada pelas espécies animais de contato,

pelo(s) sorovar (es) existente (es) naquela propriedade ou região, pelas condições ambientais e climáticas, e ainda depende do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta (GENOVEZ, 2006c).

Os hospedeiros adaptados ou de manutenção das leptospiras são responsáveis pelo ciclo de infecção, que se perpetua dentro da mesma espécie, usualmente por transmissão direta. Os sovaros adaptados aos hospedeiros naturais favorecem a sua manutenção no meio ambiente, podendo atingir por transmissão indireta os hospedeiros incidentais, que são infectados de forma acidental, geralmente pelo contato com espécie diferente. O homem se comporta na maioria das vezes como hospedeiro incidental, pois raramente se constitui em transmissor da infecção (FAINE *et al.*, 1999).

A ocorrência e a transmissão da leptospirose são influenciadas pelas características do agente infeccioso, à suscetibilidade de hospedeiros, concentração demográfica, movimentação, interação entre espécies e populações, finalidade de uso dos animais e condições ambientais (HERHOLZ *et al.*, 2006). Leptospiras sobrevivem no meio ambiente, dependendo de uma combinação de fatores como umidade e textura do solo.

As características de solo (estrutura e tipo de subsolo) que possibilitem a manutenção da umidade, das águas de superfície onde se incluem presença de matéria orgânica e pH próximo da neutralidade, assumem grande importância na perpetuação de focos de leptospirose numa região (RADOSTITS *et al.*, 2000). Solos coloidais retêm a umidade e absorvem microrganismos, presumivelmente permitindo que as leptospiras sobrevivam em condições secas. Águas da chuva e correntezas inundam as rachaduras provocadas pela dessecação, fazendo com que as leptospiras sejam liberadas para o ambiente, atingindo as águas de superfície e solo, fechando um ciclo de infecção (SMITH e SELF, 1955; KARASEVA, 1971; ELDER; ELDER *et al.*, 1986).

O sorovar Hardjo tem sido evidenciado em todo mundo com variáveis aspectos de patogenicidade. Em alguns países, a infecção de bovinos por este sorovar pode dar origem à infertilidade, abortamentos, natimortos, nascimento de animais prematuros, bezerros fracos ou aparentemente normais, mas infectados e portadores renais. Infertilidade pelo sorovar Hardjo está geralmente associada à infecção ovariana e uterina, originando aumento do intervalo entre parto-concepção e entre partos, em consequência da morte embrionária (DHALIWAL *et al.*, 1996 a e b). No Brasil, os estudos sobre a infecção pelo sorovar Hardjo aplicados em rebanhos bovinos de corte, não apresentaram impacto significativo sobre as taxas reprodutivas. Entretanto, faltam estudos conclusivos em rebanhos leiteiros, assim como, sobre a influência do genótipo das estirpes deste sorovar circulantes nas criações brasileiras (MADRUGA, DIEDERICHSEN, SCHENK, 1982; GENOVEZ *et al.*, 2001; GENOVEZ *et al.*, 2006c).

Os fatores de risco para a introdução do sorovar Hardjo em rebanhos englobam a introdução de bovinos infectados, compartilhamento de touro entre rebanhos, acesso de bovinos a águas de superfície e solos contaminados (RADOSTITS *et al.*, 2000). Além destes, a probabilidade de infecção de bovinos por este sorovar aumenta significativamente quando compartilham pastos com ovinos (PRITCHARD *et al.*, 1989; BENNETT, 1991); havendo certa evidência que os ovinos sejam hospedeiros de manutenção e reservatórios para bovinos (COUSINS *et al.*, 1989; GERRITSEN, KOOPMANS, OLYHOEK, 1994b).

Embora o sorovar Hardjo tenha nos ovinos incidência reduzida, sua disseminação entre eles é um fato real e crescente, sendo agravado em propriedades que adotam atividades consorciadas com outras espécies animais (LANGONI *et al.*, 1995). Na infecção aguda dos ovinos, semelhante aos bovinos, observam-se anorexia, dificuldade respiratória, anemia hemolítica, icterícia, urina de cor vermelha escura, febre e fêmeas prenhes abortam (RADOSTITS *et al.*, 2000).

Diante destas questões, o isolamento e identificação dos sorovares circulantes nos rebanhos nacionais são necessários para a determinação de seus genótipos, com intuito não somente de avaliar sua adaptação e interação com as condições ambientais do Brasil, mas, sobretudo definir quais estirpes tem impacto na eficiência reprodutiva e decidir a incorporação destes nas vacinas nacionais (GENOVEZ *et al.*, 2006b). Na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo, o papel do ovino ainda necessita de investigação, quer seja como susceptível a este sorovar e/ou como reservatório do sorovar Hardjo para bovinos.

2. REVISÃO LITERÁRIA

No Brasil, a ovinocultura tem grande potencial de crescimento, por dispor ainda de grandes extensões de terra. Rosanova (2004) aborda o crescimento da ovinocaprinocultura como transformador do cenário dos sistemas produtivos. No decorrer das últimas décadas, houveram transformações bruscas nos elos das cadeias produtivas pecuárias, fazendo com que a ovinocaprinocultura também ficasse a mercê dessas mudanças para a expansão dos mercados interno e externo.

O efetivo do rebanho ovino nacional é de 13.856.747 cabeças em todo o território. De acordo com o último censo agropecuário no Brasil (IBGE, 2007), a estimativa do número de ovinos no censo de 1995/1996 para a região Sudeste era de 434.054 cabeças; atualmente este número atinge 763.617 cabeças com 20.845 estabelecimentos. Em São Paulo, o número de ovinos remonta 460.746 cabeças distribuídas em 11.027 estabelecimentos, sendo 197.529 animais e 645 propriedades a mais que aqueles registrados no censo de 1995/1996.

A Região de Sorocaba, no estado de São Paulo, compreende 19 municípios: Alumínio, Araçariguama, Araçoiaba da Serra, Boituva, Cabreúva, Capela do Alto, Ibiúna, Iperó, Itu, Mairinque, Piedade, Pilar do Sul, Porto Feliz, Salto, Salto de Pirapora, São Roque, Sorocaba, Tapiraí e Votorantim (WIKIPÉDIA, 2008).

O relevo em quase toda a região apresenta declividade de terreno, sendo suave na porção do Planalto Ocidental e menos acentuada que na Serrania de São Roque. Na região existem duas serras: a de Paranapiacaba, ao sul/sudoeste, e a de Botucatu, a noroeste, além de grandes reservas minerais de rochas calcárias, areia, argila e granito (SÃO PAULO, 2003).

Os Indicadores econômicos desta região são expressivos nos setores agropecuários, industriais, comerciais e de serviços. Entretanto, uma parcela importante da população localizada ao sudoeste e sul vive basicamente da agricultura de subsistência. Nesta área há grandes entraves por extensões de terras desocupadas cuja falta de titulação gera insegurança aos verdadeiros proprietários que são impedidos que investimentos sejam realizados devido à dificuldade ao acesso ao crédito agropecuário (SÃO PAULO, 2003).

A agropecuária regional conta com a produção de hortifrutis, a atividade de reflorestamento e a pecuária de corte e de leite, cujo padrão vem melhorando por meio do aumento da capacidade das pastagens e melhoria na alimentação dos animais. A pecuária regional vem melhorando o padrão do gado de corte e leite, por meio do aumento da capacidade das pastagens e da melhoria na alimentação dos animais (SÃO PAULO, 2003).

A pesquisa de produção municipal em 2006 realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) reflete a produção animal nos municípios do Brasil. Neste censo constam os vinte maiores municípios produtores do setor pecuário, inclusive ovinocaprinocultura e seus respectivos subprodutos. Os vinte municípios com maior efetivo para ovinos encontram-se nas regiões Sul e Nordeste e não consta nenhuma cidade paulista neste levantamento (IBGE, 2006).

O Levantamento Censitário das Unidades Produtoras Agropecuárias (LUPA) é realizado pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) do Estado de São Paulo onde são apresentados os índices agropecuários de cada cidade. O número de ovinos da região de Sorocaba referente às cidades de Piedade e Salto do Pirapora, onde este projeto foi desenvolvido, é pequeno comparando com o efetivo dos municípios de outros estados (IBGE, 2006), contudo, é relevante a preocupação com o desenvolvimento da cadeia produtiva e principalmente com a sanidade dos animais.

O município de Piedade apresenta estrutura fundiária com 3.159 Unidades Produtoras Agropecuárias (UPAS), representando no total 53.908,8 ha. Nesta região, 725 UPAS (22,95%) possuem propriedades com 10,20 ha. A ocupação de pastagens está em 2.426 UPAS (11,56%) com uma extensão de área de 1.1138 ha. A exploração animal no município é liderada pela piscicultura. A ovinocultura possui 2.975 cabeças em 54 UPAS. As bovinoculturas de leite e de corte possuem respectivamente, 2.540 e 2.056 cabeças em 282 e 110 UPAS (SÃO PAULO, 2008).

A cidade de Salto do Pirapora, também incluída na região de Sorocaba, possui uma estrutura fundiária de 21.967,9 ha com 445 UPAS, sendo que 22,25% (99 UPAS) apresentam 10,20 ha cada, num total de 1.425,7 ha. A ocupação de pastagens representa 15,2% da região com 420 UPAS, num total de 6680,3 ha. A exploração animal do município é liderada pela avicultura de corte. A ovinocultura possui 450 cabeças em sete UPAS. Na bovinocultura de corte há 1.317 cabeças em 11 UPAS e a bovinocultura de leite com 442 cabeças em sete UPAS (SÃO PAULO, 2008).

Na ovinocultura, como em outros setores da pecuária, o manejo sanitário é imprescindível. Assim, o acompanhamento da saúde do rebanho, realizando a prevenção e controle de doenças, principalmente as que acometem o sistema reprodutivo, é uma maneira de evitar grandes prejuízos econômicos. A leptospirose, entre outras, é uma enfermidade que causa perdas para o produtor por atingir o sistema reprodutivo de animais de produção.

A leptospirose é uma antropozoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* spp. que apresenta ampla distribuição geográfica e de ocorrência em áreas urbanas e rurais (BRASIL, 1995).

Leptospiras são bactérias pertencentes à Ordem Spirochaetales, Família Leptospiraceae, Gênero *Leptospira* (NOGUSHI, 1918). Até 1987, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies: leptospiras patogênicas como sendo *Leptospira interrogans* e saprófitas, *L. biflexa* (LEVETT, 2001).

As leptospiras patogênicas possuem potencial para provocar a doença em animais e no homem, enquanto que as saprófitas, leptospiras de vida livre, geralmente são consideradas não causadoras da doença (WHO, 2003).

Na classificação sorológica, a unidade taxonômica básica é o sorovar (BRASIL, 2005). Os sorovares que mantêm semelhança antigênica estão organizados em 23 sorogrupos, contendo 250 sorovares de leptospiras patogênicas e saprófitas (FAINE *et al.*, 1999). Cada sorovar relaciona-se com o(s) seu(s) hospedeiro(s) preferencial (ais), ainda que uma espécie animal possa albergar um ou mais sorovares (BRASIL, 2005). Esta classificação é a base do sorodiagnóstico.

Em 1987, Paulo Hideki Yasuda, um pesquisador brasileiro, propôs uma nova classificação para leptospiras, baseando-se na hibridização por homologia do DNA. Atualmente o gênero *Leptospira* é classificado, segundo características genotípicas, em 17 gemonoespécies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. kischneri*, *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *Turneria parva*, *Leptonema illini*, *L. gemonoespecie 1*, *L. gemonoespecie 2*, *L. gemonoespecie 3*, *L. gemonoespecie 4* e *L. gemonoespecie 5* (YASUDA *et al.*, 1987). O gênero *Leptospira* compreende três grandes divisões entre as espécies: as patogênicas, as saprófitas e outras com patogenicidade indeterminada, diferenciadas por determinação filogenética (MOREY *et al.*, 2006).

Leptospiras são espiroquetas helicoidais usualmente em 0,1 µm de diâmetro por 6 a 20 µm de comprimento; sendo, portanto muito finas de se verem em luz direta, mas visíveis em microscopia de campo escuro. Apresentam ganchos em uma ou ambas as extremidades, o que as diferenciam de outras espiroquetas e são ativamente móveis devido a dois filamentos axiais (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001; WHO, 2003). A composição da membrana das leptospiras é de lipopolissacarídeo, similar à de bactérias Gram-negativas, porém com baixa atividade endotóxica (LEVETT, 2001).

São bactérias aeróbias que exigem vitaminas B1 e B12 e ácidos graxos de cadeia longa como fontes de carbono e energia; em meios de cultivo especiais, podem atingir 6-8 X 10⁹ células/mL (FAINE *et al.*, 1999).

O crescimento ótimo para as leptospiras encontra-se em pH 7,2-7,6, à temperatura de 28-30°C (FAINE *et al.*, 1999), sendo que as estirpes patogênicas crescem melhor entre 28-30°C, enquanto as saprófitas entre 11-13°C. São destruídas em temperaturas ambientais inferiores de 7°C a 10°C ou superiores a 34°C a 36°C, pela exposição direta à radiação

solar, às grandes variações de pH (<6,0 e >8,0), à elevada salinidade e a ambientes secos, necessitando 15,2 -31,4% de umidade (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001).

As leptospiros saprófitas são encontradas em lugares chuvosos ou úmidos, como águas de superfície ou solos com poças de água. Supostamente, estas leptospiros de vida livre ou ambiental, não possuem significância médica por não causarem leptospirose, porém ocasionalmente podem ser encontradas em materiais clínicos (WHO, 2003).

Leptospiros sobrevivem no meio ambiente, dependendo de uma combinação de fatores como umidade e textura do solo. As características de solo e das águas de superfície assumem grande importância na perpetuação de focos de leptospirose numa região. A estrutura e o tipo de subsolo são determinantes para a sobrevivência de leptospiros, que vivem 30 minutos em solo seco (RADOSTITS *et al.*, 2000). Solos coloidais retêm a umidade e absorvem microrganismos, presumivelmente permitindo que as leptospiros sobrevivam em condições secas. Águas da chuva e correntezas inundam as rachaduras provocadas pela dessecação, fazendo com que as leptospiros sejam liberadas para o ambiente, atingindo as águas de superfície e solo; fechando um ciclo de infecção (SMITH e SELF, 1955; KARASEVA, 1971; ELDER; ELDER *et al.*, 1986).

A permanência de leptospiros no solo depende de sua composição granulométrica, a qual pode influir na capacidade de retenção da água. Segundo Oliveira (2005), em solo arenoso (partículas com diâmetro de 0,05 a 2 mm), a infiltração da água ocorre mais rapidamente, permitindo a drenagem livre da água, entretanto com baixa retenção devido ao maior espaço poroso. Esses solos são, por natureza, mais secos porque possuem pequena capacidade de retenção de umidade em relação aos outros de textura mais fina. Partícula de silte (diâmetro 0,05 a 0,002 mm) apresenta apenas ligeira mudança de volume entre o estado seco e úmido, e sua compressibilidade é intermediária entre as frações areia e argila. Sua permeabilidade é menor em relação à areia, porém sua capacidade de retenção é bem maior. Os solos argilosos (partícula com diâmetro < 0,002 mm) possuem maior capacidade de retenção de água contra as forças da gravidade devido à presença de poros muito menores do que nos solos arenosos, portanto, sua permeabilidade é menor comparada aos solos com frações de areia e silte.

Além da umidade, a presença de matéria orgânica é outro fator importante na perpetuação do ciclo de leptospiros. Flutuação na população bacteriana tem sido associada com variações de umidade e teor de matéria orgânica, fatores os quais apresentam importante papel na distribuição de leptospiros. O maior número de isolados de solos ocorre onde há mais de 65% de umidade, sendo raramente positivos em solos arenosos, segundo

Torten *et al.* (1970 *apud* HENRY e JOHNSON, 1978)¹. A matéria orgânica se agrega melhor à argila pela característica da alta retenção de água e pela capacidade de absorver e ceder nutrientes, aumentando as características dinâmicas do solo (LEPSCH, 2002). Solos arenosos são pobres em matéria orgânica por ser rapidamente mineralizada, além da alta permeabilidade e baixa retenção de umidade (OLIVEIRA, 2005).

A presença de matéria orgânica em água e solos contaminados pela urina de animais infectados representa uma importante via de transmissão de leptospiros, que podem persistir nestas condições por até duas semanas (HENRY *et al.*, 1971).

Na água e no solo, leptospiros patogênicos também conseguem sobreviver, dependendo do pH. No solo de plantações de cana-de-açúcar com pH ácido (6,0), leptospiros sobrevivem por sete semanas, e em solos com poças de água de chuvas, sobrevivem por até três semanas (LEVETT, 2001).

Trueba *et al.* (2004) constataram a sobrevivência da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola em água destilada por 110 dias, e em meio semi-sólido a 0,5% de ágar por até 347 dias. A viscosidade permite a agregação das leptospiros, a manutenção da sua motilidade, favorecendo a enfrentarem más condições pelo acúmulo de enzimas de células lisadas. Leptospiros patogênicos sobreviventes em coleções de água podem agregar-se a outros microorganismos, formando um biofilme e assim aumentar a capacidade de resistência. Entretanto, leptospiros são afetadas pela concentração de 0,13% de NaCl, inibindo sua sobrevivência, particularmente as patogênicas (TRUEBA *et al.*, 2004).

A transmissão da leptospirose ocorre de forma direta ou indireta, principalmente de animais para o homem, sendo entre humanos muito rara (WHO, 2003).

A leptospirose tem grande importância social e econômica por apresentar elevada incidência em determinadas áreas, acarretando perdas de dias de trabalho e alto custo hospitalar. Sua letalidade em humanos pode chegar a 40% dos casos mais graves (BRASIL, 2005).

A incidência de leptospirose está fortemente associada às regiões de clima tropical e subtropical, com temperaturas elevadas e altos índices pluviométricos (WHO, 2003; PAULA, 2005). No entanto, em países desenvolvidos também pode ocorrer exposição para humanos por meio de animais infectados. Há sazonalidade em países de clima temperado quando há favorecimento da permanência de leptospiros no ambiente (LEVETT, 2001). Áreas inundadas propiciam a disseminação e a permanência do agente no ambiente, facilitando o surgimento de surtos (BRASIL, 2005). Sua ocorrência também está relacionada à alta infestação de roedores infectados e às precárias condições sanitárias.

¹ TORTEN, M., BIRNBAUM, S., KLINGBERG, M. A., SHENBERG, E. Epidemiologic investigation of an outbreak of leptospirosis in the upper Galilee, Israel. **Am. J. Epidemiol.** v. 91, p. 52-58 1970.

O mais importante fator de risco para a infecção no homem é de caráter ocupacional, principalmente nos indivíduos que trabalham na lida com animais como veterinários, magarefes, produtores rurais, inspetores de produção de carne, seguidos pelos que correm o risco de se infectarem indiretamente, como mineiros e agricultores (LEVETT, 2001; BRASIL, 2005). No Brasil, a leptospirose no meio urbano, ocorre em 55% dos casos no domicílio, em 32% no ambiente de trabalho e em 13% em situações de lazer. Comparado ao meio rural, 54% dos casos ocorrem no ambiente de trabalho, 28% no domicílio e 17% em situações de lazer (BRASIL, 2005).

O homem e os animais podem ser divididos em hospedeiros de manutenção ou acidentais (LEVETT, 2001). Os seres humanos são apenas hospedeiros acidentais e terminais dentro da cadeia de transmissão (BRASIL, 2005). Os animais domésticos, sinantrópicos e selvagens são os reservatórios essenciais para a persistência dos focos da infecção (FAINE *et al.*, 1999).

Determinadas leptospiras não causam sintomas clínicos em algumas espécies animais, sendo estes considerados hospedeiros naturais de manutenção. Quando hospedeiros de manutenção para um determinado sorovar se infectam com outro, poderão desenvolver manifestações clínicas de leptospirose e passam a se caracterizar como hospedeiros acidentais para tal sorovar (WHO, 2003).

Os hospedeiros naturais mais importantes são os roedores (ratos, camundongos) (WHO, 2003), os quais são fontes de infecção para os animais de companhia, os de produção e para o homem (LEVETT, 2001). Os roedores quando infectados, não manifestam sinais de leptospirose e, portanto, são portadores sadios, albergando a leptospira nos rins e eliminando-a de forma contínua ou intermitente no meio ambiente e desta forma, contaminando água, solo e alimentos. O *Rattus norvegicus* é o portador principal da *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae, uma das mais patogênicas para o homem. Outros reservatórios de importância são caninos, suínos, bovinos, eqüinos, ovinos e caprinos (BRASIL, 2005). Em urina ácida, leptospiras geralmente não sobrevivem. Assim, herbívoros e outros animais que produzem urina alcalina por conta de sua dieta são importantes portadores de leptospiras (FAINE *et al.*, 1999).

Leptospira spp. também está presente nos animais silvestres, considerados fontes de infecção e mantenedores de leptospiras (BOLIM, 1996; CORRÊA *et al.*, 2004) uma vez que seus habitats podem estar próximos de criações comerciais de ruminantes e/ou outros tipos de animais de produção, segundo Delben (2004 *apud* CASTRO, 2006)².

² DELBEN, A.C.B. **Purificação, caracterização e avaliação da capacidade imunogênica do lipopolissacarídeo (LPS), de *Leptospira* spp. isolada no Brasil associada ao hidróxido de alumínio ou monofosforil lipídeo A como adjuvantes.** 2004. 117p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

As portas de entrada para as leptospirosas invadirem o organismo dos hospedeiros vertebrados são pele íntegra ou com abrasões e membranas mucosas: conjuntiva, oral, nasofaríngea e genital. Nas inundações, a imersão em águas contaminadas com leptospirosas favorece a penetração devido à eliminação de barreiras naturais protetoras da pele (FAINE *et al.*, 1999; GENOVEZ, 2007).

Batista (2007) comparou a infecção experimental de hamster com *Leptospira* spp. sorovar Canicola estirpe LO4 pela exposição de pele íntegra e pele lesada de hamsters, tendo como controle a via intraperitoneal. Independentemente da condição da pele, os animais vieram a óbito em 9 a 12 dias. No entanto, a inoculação em hamsters de pele íntegra mostrou que estes se tornaram portadores renais e genitais, enquanto que os inoculados com pele lesada tiveram maior letalidade por esta estirpe.

Marchiori Filho (2007) comparou a exposição de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira* spp. sorovar Canicola estirpe LO4 pelas vias conjuntivo-nasal, cérvico-vaginal e intraperitoneal. Foi observado que a via conjuntivo-nasal e a via intraperitoneal proporcionaram maior número de mortes por leptospirose do que a via cérvico-vaginal, que por sua vez, induziu significativamente mais o estado de portador renal e genital. A transmissão entre indivíduos depende, portanto, de muitos fatores, como o clima, densidade populacional e contato entre hospedeiros de manutenção e os acidentais (LEVETT, 2001).

Fetos abortados, corrimentos uterinos e urina de animais infectados são vias de eliminação na cadeia epidemiológica da leptospirose. Todos os sorovares de leptospirosas são transmitidos entre os animais por essas vias de eliminação. A transmissão via venérea também é possível e, portanto animais doadores de sêmen, principalmente touros de Centrais de Inseminação Artificial devem ser previamente avaliados e monitorados para leptospirose (ANDRE-FONTAINE, GANIERE, 1990; RADOSTITS *et al.*, 2000).

As leptospirosas patogênicas são mantidas na natureza por animais que as abrigam nos túbulos proximais renais excretando-as pela urina, contaminando solos, rios, pântanos e outras coleções de água, atingindo indiretamente ou diretamente outros animais (FAINE *et al.*, 1999). Estes organismos podem persistir e se multiplicar em locais protegidos de anticorpos circulantes, ou seja, tratos genitais masculino e feminino, câmara anterior do olho, cérebro, articulações e os próprios rins (ADLER, FAINE, GORDON, 1981).

Ao passar pelas barreiras naturais do organismo (pele ou mucosas), leptospirosas patogênicas alcançam a corrente sangüínea (leptospirose) e as vias linfáticas, chegando aos pulmões, baço, rins e fígado, onde se multiplicam dando origem ao estágio febril. Nos órgãos, ocorrem lesões nas membranas das células endoteliais de pequenos vasos, levando ao extravasamento sangüíneo, cuja consequência imediata é a perda das junções entre as células, permitindo que leptospirosas e fluido migrem para o espaço extravascular,

ocasionando a perda da estrutura tecidual pela desintegração e morte celular (CASTRO, 2006).

A leptospirose é caracterizada pelo desenvolvimento de vasculites, dano endotelial e infiltração de células inflamatórias. Nos órgãos, o surgimento de petéquias é comum e pode ser extenso (LEVETT, 2001). A isquemia renal evolui para necrose dos túbulos contorcidos renais. Nas formas mais severas, ocorre nefrite intersticial aguda, contudo, lesões glomerulares são menos presentes. A degeneração pode evoluir para a falência renal e anúria. Lesões também são observadas em pulmões, fígado, cérebro, placenta e coração, onde estas levam a sinais clínicos de hemorragia pulmonar, falência hepática e icterícia, encefalopatia e meningite, miocardites, morte fetal e abortamento (FAINE *et al.*, 1999).

A apresentação clínica da leptospirose pode cursar como um processo brando e inaparente, até como forma grave, com sintomas severos que chegam a óbito (BRASIL, 2005). Da fase aguda ou septicêmica (leptospirose), que pode durar aproximadamente uma semana, segue para fase imune com estímulo do sistema imunológico a produzir anticorpos, os quais eliminam as leptospirose circulantes, conduzindo-as para a colonização dos túbulos renais e eliminação de leptospirose na urina, denominando leptospirose (VASCONCELLOS, 1979; LEVETT, 2001). Bovinos apresentam leptospirose, em média, por 36 dias (10 até 118 dias).

Em bovinos jovens, os sinais clínicos da leptospirose são hemoglobinúria, icterícia, anorexia e uremia. Em vacas prenhes, na maioria das vezes o único sintoma relaciona-se a esfera reprodutiva, onde ocorre morte fetal com abortamento e infertilidade. No entanto, com o decorrer do tempo, a imunidade se restabelece e abortamentos podem ocorrer somente em novilhas de primeira cria. Natimortos, nascimento de bezerras fracas e com baixo peso que podem não sobreviver também ocorrem (AMATREDJO, CAMPBELL, PATH, 1975; HANSON, 1975). Achados de leptospirose em rins de fetos apontam que estes animais não sobreviveriam após o nascimento, ou não chegariam a termo para o nascimento (ELLIS *et al.*, 1982).

A infertilidade e a Síndrome da Queda do Leite, mastite flácida, leite de cor amarela e com aspecto de colostro são manifestações clínicas em bovinos causadas principalmente pelo sorovar Hardjo (AMATREDJO, CAMPBELL, PATH, 1975; ELLIS, 1984; RADOSTITS *et al.*, 2000). Muitas vezes, a queda súbita da produção do leite pode ser o único sinal de leptospirose devido ao sorovar Hardjo em vacas lactantes (RADOSTITS *et al.*, 2000; AUSTRALIA, 2000). Abortamentos podem ocorrer várias semanas após a infecção.

Achados clínicos em pequenos ruminantes são raros, faltando uma descrição natural da doença. Muitas vezes, somente a forma aguda está presente em ovinos que manifestam a ocorrência de abortamentos (RADOSTITS *et al.*, 2000). Os animais acometidos apresentam dispnéia e mantêm a cabeça baixa, e podem disseminar leptospirose num

período de sessenta dias após a infecção (SANTA ROSA e PESTANA DE CASTRO, 1963). Ovinos infectados pelo sorovar Hardjo apresentam sinais semelhantes aos dos bovinos, onde os abortamentos são vistos como único sinal clínico. Olgolactia ou agalactia, manifestadas como queda da produção de leite em vacas, também é vista em ovelhas lactantes. A morte de cordeiros por leptospirose se deve à infecção congênita ou à inanição provocada pela agalactia aguda em ovelhas infectadas pelo sorovar Hardjo (RADOSTITS *et al.*, 2000).

O diagnóstico de leptospirose se baseia em exames laboratoriais diretos, que detectam o agente etiológico, e os indiretos, pela detecção de anticorpos produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro (GENOVEZ, 2006a).

Reações antígeno-anticorpo são usadas na identificação de estirpes (ou sorovares) de leptospiras no diagnóstico de infecções recentes e na investigação de anticorpos residuais resultantes de infecções passadas nos indivíduos (TURNER, 1970).

A soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste padrão de referência para diagnóstico sorológico e para classificação de leptospiras como preconiza a Organização Mundial de Saúde. Recomenda-se a realização do teste com os antígenos vivos cuja densidade ideal de crescimento é atingida em culturas de 4 a 14 dias (WHO, 1967) e contendo sorovares representativos de cada um dos sorogrupos, além de outros de importância regional (VASCONCELLOS, 1979). Os inconvenientes para este teste são a necessidade de uma infra-estrutura laboratorial e a manutenção de repiques das culturas vivas, o que gera mão-de-obra técnica, além de submeter o operador a riscos de contaminação (VASCONCELLOS, 1979; GENOVEZ e YASUDA, 1988).

A reação de soroaglutinação microscópica detecta tanto anticorpos IgM quanto IgG, sendo sorogrupo-específica, não especificando o sorovar da infecção; sua identificação só é possível pelo isolamento do agente e pela técnica de absorção de aglutininas (VASCONCELLOS, 1979). Atualmente, o emprego de anticorpos monoclonais e da técnica do *Pulsed Field* tem sido um avanço em relação às anteriores (HERRMANN *et al.*, 1992).

Para o resultado do teste considera-se a proporção de sororeatores para o total dos animais examinados, o que indica o grau de infecção nesta população. O provável sorovar infectante é o que aparece com maior frequência em maior título. Sorovares de um mesmo sorogrupo podem apresentar reações cruzadas, por compartilharem antígenos, tais como Hardjo e Wolffi (GENOVEZ, 2006a).

Interferências na interpretação da SAM para a indicação do potencial sorogrupo infectante se devem a evidência de reações cruzadas, a qualidade das suspensões dos antígenos que podem afetar a titulação e a ocorrência de múltiplas infecções, reações heterológicas, recente estado de portador renal sadio e consecutivas infecções em diferentes intervalos de tempo (TURNER, 1970). Sorovares que pertencem ao mesmo sorogrupo

podem co-reagirem na SAM em títulos de mesma magnitude. Isto ocorre no início da infecção, entre o sexto e o décimo primeiro dia, não se observando predominância. Este fenômeno chamado de “reação paradoxal” acontece por volta de 50% dos casos conhecidos de sorovares de muitos sorogrupos. Assim, após um longo período, a reação homóloga prevalece com o sorovar predominante, segundo Borg-Petersen (1949 *apud* TURNER, 1970)³.

Outras interferências para interpretação da SAM se devem às culturas antigas ou muito recentes, que podem afetar a qualidade da suspensão dos antígenos, interferindo nos títulos do teste (TURNER, 1970).

Portadores ou não-portadores do sorovar Hardjo não podem ser diferenciados pela titulação na soroaglutinação microscópica, pois muitos bovinos apresentam títulos abaixo de 1:100 (ELLIS, O'BRIEN, CASSELLS, 1981).

A confirmação diagnóstica da leptospirose se faz pelo isolamento do agente em materiais clínicos com a presença de bactérias viáveis em amostras clínicas como urina, sangue, fetos abortados e sêmen, cultivados em meios apropriados ou a detecção de DNA da bactéria pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (GENOVEZ, 2006a; WHO, 2007). Magajevski, Gírio e Meirelles (2007) cultivaram amostras fetais e isolaram *Leptospira* spp. de rins e fígado, sendo confirmados por PCR. Lilenbaum *et al* (2008) isolaram *Leptospira* spp. a partir de amostras de muco cérvico-vaginal de duas cabras e de uma ovelha e identificaram *Leptospira* spp. destas amostras e sêmen por PCR.

O teste de PCR permite a detecção de mínima quantidade de DNA bacteriano em qualquer material biológico, com alta sensibilidade e especificidade e em curto espaço de tempo. Regiões específicas do DNA se amplificam exponencialmente em ciclos programados de temperatura por um termociclador, e oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) com enzima *Taq DNA* polimerase, o produto se revela por eletroforese (GENOVEZ, 2006a). Outras técnicas, como imunofluorescência direta ou indireta, imunoperoxidase podem ser também empregadas, porém com menor sensibilidade e especificidade (TURNER, 1970).

Uma vez diagnosticado o agente, o tratamento do rebanho deve ser feito pelo uso de antimicrobianos antes que a infecção cause danos irreparáveis no fígado e rins. O objetivo principal do tratamento é o controle da doença e a interrupção da leptospiúria nos animais acometidos. A diidroestreptomicina ou outras tetraciclina são recomendáveis na dose de 25mg/Kg por um dia, durante três ou cinco dias (RADOSTITS *et al.*, 2000).

A eficácia do uso de estreptomicina foi comprovada pela sua persistência nos tecidos renais e no útero em rebanhos bovinos (HANSON, 1975). Gerritsen *et al.* (1994a) trataram

³ BORG-PETERSEN, C. *Proc. R. Soc. Med.* v. 42, p. 714-718. 1949.

animais com diidroestreptomicina na dose de 25mg/Kg e estes interromperam a excreção urinária de leptospiros após uma semana do tratamento e retornando aos níveis reprodutivos anteriores. Genovez *et al.* (2006c) apresentaram a eficácia da estreptomicina em um rebanho bovino acometido por um surto de leptospirose, onde amostras de urinas positivas para *Leptospira* spp. detectadas por meio de PCR, se tornaram negativas após o tratamento. A dose de 25mg/Kg de sulfato de estreptomicina é a melhor opção para tratamento contra leptospirose, permitindo que animais tratados aumentem a eficiência reprodutiva e evite prejuízos econômicos para o produtor (CAVAZINI *et al.*, 2008).

Como medida preventiva da leptospirose, deve-se vacinar o rebanho e, frente ao diagnóstico, usar a antibioticoterapia para eliminar os portadores. Como a proteção é sorovar-específica, é importante vacinar contra os sorovares prevalentes no rebanho ou na região da criação. Acredita-se que a imunidade pela vacinação seja curta, portanto, em regiões endêmicas, as doses de reforço devem ser aplicadas no mínimo duas vezes ao ano (ELLIS, 1984; PUGH, 2005).

Além da vacinação e do uso de estreptomicina nos animais, deve-se ainda aplicar medidas estratégicas que visem a redução ou eliminação dos fatores de risco.

Medidas de prevenção consistem em eliminar o contato de animais sadios com os portadores de leptospiros, da mesma espécie ou espécie diferente, população de roedores e o acesso a águas de superfície onde coabitam animais silvestres. Na espécie ovina especificamente, o manejo separado de outras espécies animais, a redução da população de roedores, fornecimento de água limpa e o uso sistemático de vacinação polivalente são as principais medidas preventivas contra a leptospirose (PUGH, 2005).

Bovinos são hospedeiros de manutenção para o sorovar Hardjo, uma vez que são portadores renais adaptados e sua adaptação tem sido demonstrada em muitas pesquisas (STOENNER, 1967; ELLIS, O'BRIEN, CASSELLS, 1981; ELLIS *et al.*, 1982; THIERMANN, 1983; ELDER *et al.*, 1985; MILLER, WILSON, BERAN, 1991; SMITH *et al.*, 1994; BLACK *et al.*, 2001; LEONARD *et al.*, 2004). Este sorovar tem sido reconhecido como uma significativa causa de alterações nos parâmetros reprodutivos como diminuição no índice de concepção, aumento nos intervalos entre partos e redução na taxa de bezerros nascidos (HIGGINS *et al.*, 1980; SLEE, McORIST, SKILLBECK, 1983; TEBRUGGE e DREYER, 1985; PRESCOTT *et al.*, 1988; ELLIS, 1994; DHALIWAL *et al.*, 1996a e b; FAINE *et al.*, 1999; GUITIAN *et al.*, 1999).

A leptospirose bovina causada pela infecção do sorovar Hardjo ocorre em todo mundo, sendo apontada em vários países como causa de infertilidade e falhas reprodutivas. A presença do sorovar Hardjo é endêmica nos países de clima tropical e sub-tropical (ELLIS, 1984). Em países como Austrália, Nova Zelândia e Holanda, apesar de endêmico, o sorovar Hardjo não causa significantes perdas em rebanhos bovinos (SLEE, McORIST,

SKILLBECK, 1983; CHAPPEL *et al.*, 1989; FAINE *et al.*, 1999). No Brasil se constitui em infecção endêmica, cujo impacto sobre as taxas reprodutivas, ainda necessitam de maiores estudos principalmente em rebanhos leiteiros (GENOVEZ *et al.*, 2006b).

Apesar da elevada soroprevalência desse sorovar nos rebanhos bovinos brasileiros, apenas dois relatos de isolamentos são descritos na literatura, e nestas a tipificação das estirpes não está esclarecida. Moreira (1994) isolou de rebanhos bovinos leiteiros o genótipo Hardjoprajitno (amostra Norma) e Langoni *et al.* (1999) a partir de fetos bovinos, identificados por anti-soros específicos para este sorovar.

Dois tipos do sorovar Hardjo são sorologicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintos: *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) e *Leptospira borgpetersenii* (Hardjobovis). O sorovar Hardjobovis, comum em bovinos, é presente em todo o mundo, enquanto Hardjoprajitno foi isolado em rebanho bovino no Reino Unido (BOLIN e ALT, 2001). O primeiro isolamento de *L. interrogans* sorovar Hardjo ocorreu em 1938 pelo Dr. J. W. Wolff a partir do sangue de um jovem agricultor javanês, chamado Hardjoprajitno, com aproximadamente 20 anos, assistido num hospital localizado numa área de seringais. O sangue foi colhido no segundo dia de febre, onde foi cultivado e a detecção de leptospiros ocorreu após três semanas do cultivo (SULLIVAN, 1970).

A soroprevalência de anticorpos para diferentes sorovares varia conforme a região e país, refletindo as diferentes incidências em cada situação (ELLIS, 1984). Na maioria dos inquéritos sorológicos realizados nos rebanhos nacionais foi empregada a estirpe Hardjoprajitno na soroaglutinação microscópica (SAM); somente mais recentemente, alguns estudos incluíram a estirpe Hardjobovis. A soroprevalência para o sorovar Hardjo em bovinos foi constatada no estado do Mato Grosso em 42,8% (216/505) (MADRUGA, AYCARDI, PUTT, 1980); em vários estados brasileiros, Giorgi *et al.* (1981) constataram que o sorovar Wolffi foi o mais presente, com 69,33% (1.897/2.736), porém neste levantamento, não constava o sorovar Hardjo na coleção de antígenos; no Rio de Janeiro 20,98% (85/45) (LILEMBAUM, DOS SANTOS, 1995; LILEMBAUM, DOS SANTOS, 1996); Goiás com 5,2% (18/349) (JULIANO *et al.*, 2000); em São Paulo 12,5% (15/120) (LANGONI *et al.*, 1999); 36,4% (11.412/ 31.325) (FAVERO, 2000) e 46% (1.538/3.338) (CASTRO, 2008); na Amazônia Oriental, Pará, com 61,2% (41/67) das propriedades estudadas (HOMEM *et al.*, 2000; HOMEM *et al.*, 2001); Bahia em 4,0% (11/228) índice menor que encontrado para o sorovar *Icterohaemorrhagiae* 27,2% (62/228) (VIEGAS, CALDAS, OLIVEIRA, 2001); Minas Gerais em diferentes estirpes de Hardjo (Norma) 23,7% (1.970/8.317), (OMS) 19,7% (7.653/38.883) e Hardjobovis 13,8% (372/2.698) (ARAUJO *et al.*, 2005); na região do Pantanal com 58,74% (84/143) para estirpe Hardjoprajitno e 40,97% (58/143) para Hardjobovis (TOMICICH *et al.*, 2007); Paraíba com 16,04% (376/ 2.343) (LAGE *et al.*, 2007) e

Mineiro *et al.* (2007) no Piauí encontraram 39,5% (412/1.044) bovinos reagentes para o sorovar Hardjo.

Existem muitos sorovares que compartilham antígenos, como os do sorogrupo Sejroe, que confundem os resultados de soroprevalência nos rebanhos brasileiros e provavelmente em outros países. Em vários estudos soroepidemiológicos de rebanhos bovinos brasileiros, o sorovar Hardjo tem sido observado em associação com Wolffi. Por pertencerem ao mesmo sorogrupo, Hardjo e Wolffi podem ocorrer em associação (FAINE, 1982). No levantamento sorológico realizado por Pellegrin *et al.* (1999) em bovinos no Pantanal matogrossense, os sorovares Hardjo e Wolffi e Hardjo-CTG, isolado por Moreira (1994) apresentaram as maiores reações, no entanto, estas podem ocorrer pela semelhança antigênica, com reações cruzadas na sorologia. Favero (2000), em seu levantamento sorológico de diversos estados brasileiros apontou esta questão com ocorrência no Pará 20% (61/305) e em Roraima com 33% (7/22). Martins (2005) estudou a prevalência de leptospirose em propriedades no município de Pirassununga – SP, e nos rebanhos bovinos o sorovar Hardjo foi o prevalente em 43,3% (33/76), seguido de Wolffi em 11,8% (9/76). Castro (2006) analisou amostras de bovinos em todo estado de São Paulo, onde reações cruzadas entre os sorovares Hardjo e Wolffi 21% (711/ 3.338) foi observada em todas as regiões, com titulação semelhante. Gotti (2007) comparou a sorologia de duas colheitas de dois grupos de touros doadores de sêmen, e constatou a presença de reações cruzadas para Hardjo e Wolffi. Magajevski, Gírio e Meirelles (2007) em São Paulo, observaram que 44,7% (80/179) das vacas enviadas ao abate eram reagentes para o sorovar Hardjo e 28,5% (51/179) reagentes para Wolffi. Consta nesses trabalhos elevada frequência de reações cruzadas entre os sorovares Hardjo e Wolffi.

O sorovar Guaricura, pertencente ao mesmo sorogrupo Sejroe dos sorovares Hardjo e Wolffi, foi isolado pela primeira vez no Brasil por Santa Rosa *et al.* (1980) a partir de amostras de fígado provenientes de um abatedouro, apesar deste sorovar pertencer na época ao sorogrupo Hebdomadis. Um segundo isolamento do mesmo sorovar foi realizado por Vasconcellos *et al.* (1998) a partir de amostra de urina de uma búfala de rebanho leiteiro.

O papel patogênico dessas estirpes sobre as taxas reprodutivas ainda não está totalmente esclarecida. Este fato explicaria o pequeno número de isolados do sorovar Hardjo no Brasil, embora com elevada soroprevalência. O freqüente isolamento e identificação de estirpes circulantes nos rebanhos nacionais, assim como a identificação de seus genótipos, não só demonstra sua adaptação às condições climáticas do país, mas pela decisão da vacinação, na ordem de definir quais estirpes têm impacto na eficiência reprodutiva e quais delas devem ser incorporadas nas vacinas nacionais (GENOVEZ *et al.*, 2006b).

Favero (2000) analisou a soroprevalência de ovinos no estado de São Paulo em 284 amostras, onde a variante sorológica foi *Icterohaemorrhagiae*; enquanto no estado do Rio Grande do Sul, Hermann *et al.* (2004) estudaram a soroprevalência do rebanho ovino em 18 municípios, verificando soroprevalência do sorovar Hardjo.

A prevalência de Hardjo em ovinos e bovinos é semelhante em muitos países. Na Austrália e Nova Zelândia registra-se a presença do sorovar nas duas espécies, tendo sido isolado de rebanhos ovinos neozelandeses saudáveis (AUSTRALIA, 2000). Nestes países acredita-se que o ovino seja o hospedeiro de manutenção para Hardjo, o que não foi demonstrado em estudos realizados no Reino Unido (ELLIS *et al.*, 1983).

A transmissão de *Leptospira* spp. sorovar Hardjo estirpe Hardjobovis de ovinos infectados naturalmente para ovinos e bovinos sadios foi observada por Geritsen, Koopmans e Olyhoek (1994b), que indagaram se os ovinos seriam hospedeiros de manutenção de Hardjobovis e, portanto, se ovinos deveriam ser também focos nos programas de controle desta infecção em rebanhos bovinos consorciados.

Castro (2006) analisou vários fatores de risco para o aparecimento de leptospirose nos rebanhos bovinos de algumas regiões do estado de São Paulo dentre estes, a criação de ovinos seria uma possível causa de leptospirose para bovinos, pelo compartilhamento da pastagem. Entretanto, sua transmissão parece estar muito mais relacionada ao aspecto densidade de cabeças por área de pastejo como facilitador de contágio (ELLIS, O'BRIEN, CASSELLS, 1981; GENOVEZ *et al.*, 2006c).

Os fatores de risco envolvendo o manejo de animais, pelo risco da introdução do sorovar Hardjo no rebanho, englobam a aquisição de bovinos infectados, bovinos e ovinos dividindo o mesmo pasto ou áreas comuns, aquisição ou compartilhamento de mesmo touro contaminado, e acesso de bovinos a águas de superfície contaminada (RADOSTITS *et al.*, 2000).

Diante destas questões, o isolamento e identificação dos sorovares circulantes e a determinação de seus genótipos nos rebanhos nacionais são necessários, com intuito não somente de avaliar sua adaptação e interação com as condições de manejo e ambientais do Brasil, mas, sobretudo definir quais estirpes têm impacto na eficiência reprodutiva e decidir a incorporação destes nas vacinas nacionais (GENOVEZ *et al.*, 2006b).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose causada pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo, identificando os fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos, avaliando-se manejos sanitário e zootécnico, bem como a influência das condições edafoclimáticas regionais na manutenção e transmissão do agente entre os animais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho contou com o apoio logístico e laboratorial da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba (UPD) / Centro de Insumos Estratégicos – Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA) Regional, no qual foram centralizadas as primeiras ações após a colheita das amostras, como separação e centrifugação de soro, urina, água e suspensão de solo e o cultivo das amostras clínicas, águas e solo para isolamento das leptospiros. Nesta etapa participaram os pesquisadores Daniela Chiebao e Fábio Henrique de Lima Gabriel, ambos da UPD de Sorocaba – APTA regional - Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo e do médico veterinário Paulo Thomaselli da Casa de Agricultura de Piedade – SP.

4.1. Seleção dos rebanhos para formação dos grupos

Com o intuito de se excluir interferência de outras enfermidades reprodutivas nos dados de produtividade dos rebanhos foi realizado o diagnóstico diferencial para brucelose, clamidífilose, campilobacteriose genital bovina, micoplasmose, Maed-Visna, pestívirus (vírus da diarréia viral bovina - BVD), toxoplasmose e neosporose. Também foi avaliado o nível de parasitismo pelo método de OPG, visando estabelecer o perfil sanitário dos animais. Esses dados encontram-se no Apêndice.

Na primeira etapa foram analisadas oito propriedades, sendo cinco de criações consorciadas entre ovinos e bovinos que compartilhavam mesmo pasto e manejos sanitário e zootécnico e três exclusivas de ovinos. Os animais do sistema consorciado, por compartilharem pastos e manejo, foram considerados como um único rebanho, não sendo seus resultados separados por espécie. A estes rebanhos foi aplicado um questionário epidemiológico.

A partir destes rebanhos foram selecionados quatro, sendo dois consorciados e dois de criação exclusiva de ovinos que apresentavam animais reagentes para *Leptospira* spp. sorovar Hardjo, que não faziam uso de vacinação contra leptospirose e foram então submetidos ao isolamento e identificação de leptospiros (Tabela 1). Das quatro propriedades selecionadas foram realizadas as análises de águas de superfície e de bebida, de solo e condições edafoclimáticas.

Tabela 1. Identificação das propriedades analisadas na região de Sorocaba, respectivos sistemas de criação e número de animais examinados relativos a duas fases de colheita de amostras. São Paulo, 2008.

Identificação	Condição	Localidade	Número de animais examinados			
			1ª FASE *		2ª FASE **	
A	O	Piedade SP	7 ovinos		91 ovinos	
B	O	Piedade SP	6 ovinos		...	
C	O	Piedade SP	11 ovinos		37 ovinos	
D	C	Piedade SP	3 ovinos***		...	
E	C	Araçoiaba da Serra- SP	4 ovinos	2 bovinos	...	
F	C	Piedade SP	3 ovinos	3 bovinos	30 ovinos	14 bovinos
G	C	Piedade SP	16 ovinos	1 bovinos	...	
H	C	Salto do Pirapora - SP	7 ovinos	4 bovinos	80 ovinos	3 bovinos

O - Criação exclusiva de Ovinos; C - Criação consorciada bovinos e ovinos. *10% dos animais adultos; **100 % dos animais adultos; ***propriedade anteriormente consorciada.

Castro (2006) avaliou a soroprevalência da leptospirose bovina no estado de São Paulo, subdividindo-o em sete regiões a partir das amostras de soro colhidas para o exame de brucelose, que contemplavam no Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). A região de Sorocaba, com amostragem de 88 soros de bovinos de leite, apontou o sorovar Hardjo como prevalente em 57,95% (52/88). Diante desta informação, assumiu-se que este sorovar está circulante nesta população bovina e, portanto, o estudo não incluiu propriedades com criação exclusiva de bovinos.

4.2. Animais

Cinquenta e sete ovinos entre rebanhos de criação exclusiva e consorciada e 10 bovinos provenientes das propriedades consorciadas com os ovinos foram avaliados na primeira fase; enquanto que 255 animais, 238 ovinos e 17 bovinos, provenientes dos quatro rebanhos selecionados foram avaliados na segunda fase.

4.4. Colheita de amostras clínicas

Amostras sorológicas de dez por cento dos animais adultos dos oito rebanhos foram colhidas na primeira fase e 100% na segunda fase. Foram colhidas amostras de urina de 10% dos animais adultos dos quatro rebanhos selecionados.

4.3.1. Soro

Cerca de 10 mL de sangue dos animais foram colhidos de forma asséptica por tubos a vácuo com gel, antes do fornecimento de ração, separado o soro sanguíneo, transferido para frasco estéril e mantido a -20°C até o momento da utilização.

4.3.2. Urina

Aplicou-se furosemida (Lasix®) na dose de 0,8 mg/kg endovenoso. Enquanto era aguardada a micção, higienizou-se a região perineal com água e sabão, sendo enxaguada e em seguida enxugada com toalha descartável. Foram desprezados os primeiros jatos e colheram-se os demais em frasco esterilizado. As amostras foram cultivadas para leptospiros imediatamente após a colheita.

4.4. Colheita de amostras ambientais

As amostras ambientais, solo e águas de superfície e bebida, foram colhidas das quatro propriedades selecionadas visando o isolamento de leptospiros e medida do pH. As amostras de solo destinavam-se também a análise estrutural e de matéria orgânica.

4.4.1. Águas de superfície e de bebida

Três amostras de 20 mL de água de bebida e águas de superfície dos locais de pastagem dos animais foram colhidas e acondicionadas em frascos com tampa de rosca estéreis e imediatamente cultivadas para leptospiros. Também imediatamente após a colheita foi medido o pH da água por meio de fitas de indicação universal Merck.

4.4.2. Amostras de solo

Três amostras de aproximadamente 100 gramas de solo foram colhidas de regiões próximas a alagados, lagos, rios e mananciais e ainda da pastagem, preferivelmente pela manhã e cultivadas para leptospiros.

Para caracterizar a granulometria do solo foram colhidas aleatoriamente cinco amostras da superfície do pasto e colocadas em sacos próprios. As amostras foram colhidas com trado tipo holandês e cada porção retirada foi destinada a um de dois baldes, separados de acordo com a profundidade (0-20 cm ou 20-40 cm). Ao final dos cinco pontos, as amostras de cada balde foram misturadas e uma amostra final, composta de cinco amostras simples, foi colhida para análise (cerca de 2 kg).

Para a permeabilidade foram avaliados cinco pontos do pasto, sendo as medições efetuadas dentro de um anel de 15 cm de diâmetro com 10 cm de profundidade do solo empregando-se permeâmetro modelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) em duas épocas distintas: chuva (abril) e estiagem (setembro).

A permeabilidade do solo e o estudo granulométrico foram realizados pelo Dr. Sidney Rosa Vieira e Dr. Márcio Koiti Chiba, do Centro de Solos e Recursos Ambientais, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

4.6. Exames laboratoriais das amostras clínicas

Estes exames foram realizados no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, São Paulo.

4.5.1. Soroaglutinação microscópica para leptospirose

A reação de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos (FAINE *et al*, 1999) é considerada a prova padrão para leptospirose, segundo a Organização Mundial de Saúde, empregando a detecção de níveis de aglutininas anti-leptospiras em amostras sorológicas.

4.5.1.1. Antígenos

Foram utilizados 26 sorovares da coleção de antígenos, sendo cada sorovar representante de seu sorogrupo conforme Quadro 1.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar
<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc
<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri
<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Butembo
<i>L. noguchii</i>	Panamá	Panamá
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castelonis
<i>L. borgpetersenii</i>	Celledoni	Whitcombi
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
<i>L. interrogans</i>	Grippothyphosa	Grippothyphosa
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Sentot
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajtino
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes

Quadro 1. Leptospiras empregadas como antígenos na Reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), relação de espécies, sorogrupos e sorovares. São Paulo, 2008.

Os sorovares foram mantidos em meio líquido de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) modificado (ALVES *et al.*, 1996) suplementado com 15% de soro estéril de coelho e inativado a 56°C por 30 minutos, enriquecido com 1% de piruvato de sódio, 1% de cloreto de cálcio, 1% de cloreto de magnésio e 3% de L-asparagina e incubadas durante sete a dez dias em estufa bacteriológica a 28°C. Cada cultura foi examinada quanto à pureza e ausência de auto-aglutinação em microscopia de campo escuro. A concentração antigênica foi acertada para conter aproximadamente de 100 a 200 microrganismos por campo microscópico (100X).

4.5.1.2. Triagem, titulação dos soros e interpretação de resultados

Cinquenta microlitros de cada amostra de soro diluída a 1:25 em solução salina tamponada de Sorënsen (pH 7,4), foram colocados em microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços (COSTAR), e acrescentados de 50 µL do antígeno, obtendo-se diluição inicial 1:50. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por três horas. As leituras foram realizadas em microscópio óptico Jena Zeiss com condensador de campo escuro seco, com lente objetiva Epiplan 10x/0,20 e de ocular 10 (100X) observando-se a formação de aglutinações. Na triagem, os soros na diluição de 1:50 que revelaram 50% de leptospiras aglutinadas foram titulados frente aos respectivos antígenos. Soros reagentes na triagem foram testados para a determinação do título final de aglutininas anti-leptospiras, efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois. O título final foi a recíproca da maior diluição que apresentou pelo menos 50% de leptospiras aglutinadas (FAINE *et al.*, 1999).

4.5.2. Isolamento e identificação de *Leptospira* spp.

Após a obtenção de urina, 1 mL foi adicionado em 9 mL em um tubo contendo meio EMJH (DIFCO) suplementado com 15% de soro estéril de coelho e inativado a 56°C por 30 minutos, enriquecido com 1% de piruvato de sódio, 1% de cloreto de cálcio, 1% de cloreto de magnésio e 3% de L-asparagina e acrescido de mistura antibiótica 5-fluoracil 1% e ácido nalidixico 4% (ALVES *et al.*, 1996) e o mesmo volume em meio de Fletcher (DIFCO) contendo a mesma mistura antibiótica, sendo mantidos a 30°C por 24 horas, e tendo sido

então, semeado 1 mL respectivamente para tubos contendo EMJH e Fletcher livres de antibióticos.

Uma alíquota das amostras de urina foi filtrada em pré-filtro 0,45 µ e filtro Millipore 0,65 µ e três a quatro gotas do filtrado foram semeadas em tubos com EMJH, sem solução antibiótica.

Outra alíquota das amostras de urina foi também submetida à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-4}), 1 mL em 9 mL de meio EMJH nas condições descritas acima, sem antibióticos, conforme descrito por Galton *et al.* (1962).

Todos os tubos foram incubados em condições aeróbicas a 30°C por 60 dias, procedendo-se à leitura semanalmente, utilizando-se microscópio Jena Zeiss com condensador de campo escuro seco, com lente objetiva Epiplan 20x/0,20 e de ocular 10 (100X).

4.5.3. Detecção de DNA de *Leptospira* spp. utilizando PCR em amostras de urina

Para a detecção de DNA de *Leptospira* spp. foi aplicada a técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em *pools* de urinas de dois ou três animais dos rebanhos selecionados, no total de sete *pools* de ovinos: três provenientes dos rebanhos exclusivos de ovinos e quatro dos consorciados; e ainda dois *pools* de dois bovinos das criações consorciadas.

4.5.3.1. Extração de DNA

O método empregado para a extração de DNA foi pela técnica fervura-fenol (RICHTZENHAIN *et al.*, 2002), onde 200 µL de cada amostra (*pool* de urina) foi diluída com 400 µL TE (Tris EDTA pH 7,0). Os tubos foram agitados e centrifugados a 13.000 rpm por 30 minutos. Desprezado o sobrenadante, ressuspendeu-se a solução em 300 µL TE. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria seco para a fervura em 99°C por 15 minutos. Após esse período, foram adicionados 150 µL de fenol tamponado. Agitadas as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se 300 µL da fase aquosa para um novo microtubo. Adicionou-se 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram agitadas e centrifugadas novamente a 13.000 rpm por mais 5 minutos. Transferiu-se 200 µL da fase aquosa para novo microtubo. Adicionou-se 40 µL de

acetato de sódio 2 M. Adicionou-se 480 µL de etanol puro. As amostras foram homogeneizadas por inversão e mantidas a -20°C por pelo menos três horas. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante por inversão. Adicionou-se 500 µL de etanol 70% em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante por inversão. As amostras foram secas em aparelho Vacuge® Eppendorf a 45°C por 15 minutos. Adicionou-se 40 µL de TE. As amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C por 15 minutos. As amostras foram estocadas a -20°C.

4.5.3.2. Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para a identificação de leptospiros nas amostras de urinas, nas reações de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) Lep1 e Lep2 (Lep 1: 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3' e Lep 2: 3' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 5') conforme descrito por Mérien *et al.* (1992). Os oligonucleotídeos iniciadores empregados são gênero específico que amplificam fragmentos de 331 pb. Para uma reação final de 50µL, foram adicionados 17,2 µL de água, 5 µL de tampão 10 X (500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 8 µL da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]), 5 µL dos oligonucleotídeos iniciadores a 10 pM (Lep 1 e Lep 2), 4 µL de *Taq* DNA polimerase e 10 µL da amostra de DNA extraído.

As ampliações foram realizadas em máquina termocicladora Peltier Thermal Cycle-200 (MJ Research). Antes do ciclo, inicialmente as amostras foram submetidas à desnaturação de 95°C por 5 minutos e a seguir empregados 29 ciclos de amplificação divididos em quatro fases: desnaturação a 95°C por 60 segundos, hibridização a 63°C por 90 segundos, extensão a 72°C por 120 segundos e a extensão final a 72°C por 10 minutos.

Como controle positivo para a leptospirose foi utilizado o sorovar Hardjo estirpe Hardjoprajitino. Para o controle negativo da PCR foi utilizada a mistura da reação da PCR, contendo 10 µL de água ultra-pura.

4.5.3.3. Análise do produto amplificado

A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045M TRIS-Borato e 1mM de EDTA, pH 8,0) e

submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. O padrão de peso molecular empregado foi de 100 pb. O gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

4.6. Exames laboratoriais das amostras ambientais

4.6.1. Cultivo de águas de superfície e de bebida para *Leptospira* spp.

As amostras de águas de superfície e de bebida foram centrifugadas a 5.000Xg por 15 minutos e uma alíquota dos sobrenadantes foi observada em microscopia de campo escuro. Um mL do restante foi cultivado como descrito no item 4.5.2.

4.6.2. Cultivo de amostras de solo para *Leptospira* spp.

Um grama de cada amostra de solo foi suspenso em 5 mL de água destilada estéril e esta suspensão foi cultivada conforme descrito no item 4.5.2.

4.6.3. Exames de permeabilidade, granulometria, índice de matéria orgânica, nutrientes e pH de solo.

As amostras de solo foram analisadas no Departamento de Conservação do Solo do Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo.

A permeabilidade foi realizada por um permeâmetro de campo de carga constante modelo IAC - Instituto Agronômico de Campinas, que permite medições no perfil superficial de qualquer tipo de solo acima do lençol freático. As medições foram efetuadas em orifícios abertos com trado apropriado de 6,5 cm de diâmetro a 10 cm de profundidade (VIEIRA, 1995/1998).

As amostras foram submetidas à análise granulométrica, que inclui matéria orgânica, pH, macro e micro nutrientes, segundo Van Raij *et al.* (1987). A análise granulométrica tem

por objetivo determinar a distribuição percentual das partículas primárias do solo, ou seja, a textura do solo, onde se verifica a partícula predominante de cada pastagem (argila, silte, areia).

As amostras colhidas a 10 cm de profundidade foram deixadas secando ao ar, trituradas no pilão e peneiradas para separar a terra fina seca ao ar (TFSA), a fração do solo menor de 2 mm para análise. Foram então utilizados dez gramas do solo em 50 mL de solução dispersante (hidróxido de sódio com hexametáfosfato de sódio), transferidos para uma garrafa de Stohmann e colocados no agitador rotatório de Wieger a 30 rpm durante 16 horas. Esta suspensão foi colocada em uma proveta calibrada com capacidade de 500 mL por uma peneira com malha de 0,2 mm, completando-se o volume com água destilada. O material retido foi lavado com jato forte de água, seco a 105°C e pesado, sendo considerada areia grossa. A suspensão de solo restante determinou a argila e o silte. O volume da proveta foi agitado por 30 segundos, tampado com um êmbolo emborrachado e reservado por quatro horas para a sedimentação. Para a fração de silte foi introduzida uma pipeta de 10 mL a uma profundidade de 5 cm com sucção contínua para evitar turbilhonamento, transferida para uma cápsula de porcelana e seca em estufa entre 105 – 110°C por no mínimo oito horas. Foi repetida como prova em branco a solução dispersante. As cápsulas foram resfriadas em dessecação contendo cálcio de anidro e pesadas rapidamente em balança com precisão (CAMARGO *et al.*, 1986).

A determinação de matéria orgânica foi realizada pelo método Walkley-Black, que consiste medir a oxidação da matéria orgânica utilizando um agente oxidante forte, medindo o calor desprendido (CAMARGO *et al.*, 1986).

Um grama de solo foi dissolvido em 5 mL de solução salina e o pH foi medido empregando-se solução de CaCl₂ que, pelo potenciômetro de vidro e cabomelano, mede a atividade do íon H⁺ em suspensões de solo (VAN RAIJ *et al.*, 1987). Os micronutrientes foram analisados pela solução de ácido dietileno-triaminopentacético e trietanolamina (DTPA-TEA) que consiste observar a quelação do elemento a determinado pH 7,3 e sua determinação por espectrofotometria de absorção atômica (CAMARGO *et al.*, 1986).

4.7. Dados climatológicos da região

Com o intuito de se conhecer as condições ambientais de umidade e temperatura média onde se localizam as propriedades investigadas, foram compilados os dados pluviométricos e as variações térmicas da cidade de Piedade, representante da região de Sorocaba – SP. As medições de temperaturas média máxima e média mínima foram obtidas

no Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO), juntamente com o índice pluviométrico da Região de Sorocaba, Estado de São Paulo.

4.8. Aplicação do questionário epidemiológico

Nas oito propriedades analisadas foi aplicado um questionário epidemiológico (Anexo) que serviu de parâmetro para o estudo de possíveis fatores de risco associados à soropositividade para o sorovar Hardjo.

4.10. Tratamento dos dados

As informações obtidas com os questionários foram inseridas em um formulário eletrônico elaborado no programa Microsoft Access[®]. Para o estudo de fatores de risco associados à soropositividade para o sorovar Hardjo foi realizada uma análise de associação pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado (ZAR, 1999). Uma propriedade foi considerada positiva para o sorovar Hardjo quando pelo menos um animal foi soropositivo para esse sorovar. O nível de significância adotado foi de 5%.

Para o cálculo da soroprevalência da leptospirose nos quatro rebanhos selecionados, foi considerado o número de reações positivas sobre o total de animais (por espécie) da propriedade. Foi considerado como o provável sorovar infectante o mais freqüente e que apresentou maior título na SAM. Na ocorrência de empate sorológico para dois ou mais sorovares, estes animais foram desconsiderados da análise.

5. RESULTADOS

Pelo perfil sanitário dos rebanhos, estes se apresentaram livres das principais doenças da reprodução, como campilobacteriose, micoplasmoses, brucelose, clamidofilose e Maedi-Visna, mas houve animais reagentes para pestivírus (Vírus da Diarréia Viral Bovina – BVDV), toxoplasmose e neosporose. O exame de OPG revelou infestação parasitária em 7/8 rebanhos investigados (Apêndice).

Dos oito rebanhos analisados para leptospirose, todos apresentaram pelo menos um animal reagente para os diferentes sorovares, independentemente de consorciados ou exclusivos de ovinos (Tabela 2).

Tabela 2. Presença de leptospirose investigada nos rebanho de criação exclusiva de ovino ou consorciada com bovino da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Identificação	Condição	Leptospirese	Sorovares
A	O	6/7*	Pyrogenes (2/6)
B	O	3/6	Copenhageni (1/3) Autumnallis+Castelonis+Javanica (1/3) Pyrogenes (1/3)
C	O	8/11	Autumnalis (7/8)
D	C	2/3	Javanica (1/2) Hardjo (1/2)
E	C	3/6	Hardjo (2/3)
F	C	6/6	Hardjo (4/6)
G	C	3/17	Whitcombi+Sentot (1/3) Icterohaemorrhagiae (1/3) Hardjo (1/3)
H	C	8/11	Icterohaemorrhagiae (5/8) Hardjo + Wolffi (3/8)

* total de reagentes sobre 10% do total de animais do rebanho.

Do total dos animais avaliados, 51,16% (22/43) dos rebanhos consorciados, e 70,83% (17/24) dos exclusivos apresentaram soropositividade. A presença de aglutininas contra leptospiros relacionadas ao tipo de criação dos rebanhos ou quanto ao número total de animais dos rebanhos não apresentou significância estatística (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de rebanhos e de animais reagentes para *Leptospira* spp. em condições criatórias exclusivas de ovinos e consorciadas com bovinos da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Condição	Rebanhos	Animais
Conсорciadas	5/5	22/43 (51,16%)
Exclusivas	3/3	17/24 (70,83%)
<i>p</i>	0,191

Os resultados da tabela 4 referem-se à análise das respostas dos questionários aplicados aos oito rebanhos e às condições ambientais das propriedades com vistas à exposição aos possíveis fatores de risco para a infecção pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo. Quando avaliado o total de rebanhos em condições criatórias exclusivas frente aos consorciados com bovinos, o fator com alta significância para o aparecimento do sorovar Hardjo foi a condição consorciada do rebanho ($p= 0,018$). Quando avaliado o total de ovinos em condições criatórias exclusivas frente aos ovinos consorciados com bovinos, o risco associado à consorciação das espécies foi significativo para a presença deste sorovar ($p=0,005$). Os demais fatores analisados não mostraram significância estatística.

Tabela 4. Fatores de risco associados à presença de animais sororeagentes para o sorovar Hardjo para os oito rebanhos, entre criação exclusiva de ovino ou consorciados com bovino da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Fatores	Propriedades				p	Animais				p
	Positivas		Negativas			Positivos		Negativos		
	N	%	N	%		N	%	N	%	
Rebanho consorciado										
Não	0	0,0	3	100,0		0	0,0	24	42,9	
Sim	5	100,0	0	0,0	0,018*	11	100,0	32	57,1	0,005*
Manejo										
Semi-intensivo	2	40,0	2	66,7		5	45,5	25	44,6	
Extensivo	3	60,0	1	33,3	1,000	6	54,5	31	55,4	1,000
Atividade principal										
Ovinocultura	1	20,0	2	66,7		2	18,2	21	37,5	
Outras	4	80,0	1	33,3	0,464	9	81,8	35	62,5	0,307
Acesso a aguadas										
Não	1	20,0	2	66,7		1	9,1	20	35,7	
Sim	4	80,0	1	33,3	0,464	10	90,9	36	64,3	0,152
Presença de roedores e animais silvestres										
Não	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Sim	5	100,0	3	100,0	...	11	100,0	56	100,0	...
Existência de rebanhos vizinhos										
Não	2	40,0	2	66,7		2	18,2	31	55,4	
Sim	3	60,0	1	33,3	1,000	9	81,8	25	44,6	0,050
Compra de animais										
Não	1	20,0	2	66,7		3	27,3	25	44,6	
Sim	4	80,0	1	33,3	0,464	8	72,7	31	55,4	0,337

* significativo (p < 0,05).

Tabela 4. Continuação

Fatores	Propriedades				p	Animais				p
	Positivas		Negativas			Positivos		Negativos		
	N	%	N	%		N	%	N	%	
Vermifugação										
Não	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Sim	5	100,0	3	100,0	...	11	100,0	56	100,0	...
Exames de rotina										
Não	3	60,0	2	66,7		7	63,6	26	46,4	
Sim	2	40,0	1	33,3	1,000	4	36,4	30	53,6	0,475
Quarentena na entrada										
Não	2	40,0	1	33,3		3	27,3	13	23,2	
Sim	3	60,0	2	66,7	1,000	8	72,7	43	76,8	0,716
Vacinação (qualquer vacina)										
Não	0	0,0	1	33,3		0	0,0	7	12,5	
Sim	5	100,0	2	66,7	0,375	11	100,0	49	87,5	0,589
Ocorrência de problemas reprodutivos										
Não	0	0,0	1	33,3		0	0,0	7	12,5	
Sim	5	100,0	2	66,7	0,375	11	100,0	49	87,5	0,589
Desratização										
Não	2	40,0	3	100,0		5	45,5	28	50,0	
Sim	3	60,0	0	0,0	0,196	6	54,5	28	50,0	0,957

O sorovar Hardjo foi pouco freqüente na maioria dos rebanhos, no entanto, os rebanhos F e H foram selecionados para o cultivo de leptospiros, uma vez que sua presença está relacionada ao contato com bovinos. Uma vez que a presença de animais reagentes ao sorovar Hardjo não foi detectada em rebanhos exclusivos de ovino, os rebanhos A e C foram selecionados pela ocorrência de animais reagentes para *Leptospira* spp., mas sobretudo pela presença marcante de fatores de risco à infecção por leptospiros, tais como os manejos zootécnico e sanitário e condições ambientais.

Os resultados da soroprevalência de leptospirose nos rebanhos selecionados encontram-se na Tabela 5. Nota-se nesta tabela que o número de reagentes dos rebanhos A e C observados na Tabela 2, foi inferior ao obtido na segunda avaliação sorológica. Este fato ocorreu em virtude da substituição de animais do rebanho original e a aquisição de novos animais pelo proprietário.

Tabela 5. Soroprevalência para leptospirose nos rebanhos A, C, F e H da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Identificação	Condição	Total de Animais por Espécie	Reagentes/ Total Examinado (%)	Sorovar Prevalente	Sororeagentes para Hardjo
A	O	Ovinos 91	1/91 (1,1%)	Pyrogenes (1/1)	-
C	O	Ovinos 37	6/37 (16,2%)	Autumnalis (5/6)	-
F	C	Bovinos 14 Ovinos 30	$\frac{9}{44}$ (20,45%): 3/14 bovinos 6/30 ovinos	Hardjo ou Hardjo e Wolffii (6/9)	1/3 bovinos 5/6 ovinos
H	C	Bovinos 03 Ovinos 80	$\frac{21}{83}$ (25,3%): 1/3 bovinos 20/80 ovinos	Icterohaemorrhagiae (8/21)	1/3 bovinos 3/20 ovinos

O - Criação exclusiva de Ovinos; C - Criação consorciada bovinos e ovinos

Do total de urinas (29) cultivadas para isolamento de *Leptospira* spp. nenhuma apresentou crescimento para este agente.

De 105 cultivos das amostras de água de superfície, um foi isolado *Leptospira* spp. (Tabela 6) da propriedade F, com crescimento em EMJH e formação do anel de Dinger em meio Fletcher e confirmado pela PCR (Figura 1). O isolado foi encaminhado para o Departamento de Bacteriologia da Fundação Osvaldo Cruz-Rio de Janeiro (FIOCRUZ) para identificação por meio de soroaglutinação microscópica com 25 soros hiper-ímmunes padrões. Os resultados apontaram reações inespecíficas para os sorogrupos Australis, Djasiman, Shermani, Autumnalis e Ballum com títulos inferiores a 400 (BALASSIANO, informação pessoal)⁴.

⁴ Ilana Teruszkin Balassiano - Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose (WHO Collaborating Center for Leptospirosis) Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Comunicação pessoal, novembro, 2008.

Tabela 6. Cultivos de amostras ambientais (águas de superfície e solo) das propriedades A, C, F e H da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Propriedade	Material	Local	F	ATB	Repique ATB	D.0	D.1	D.2	Repique em Fletcher
A	água	bebedouro	N	N	N	N	N	N	
		várzea	N	N	N	N	N	N	
	solo	várzea	N	N	N	N	N	N	
C	água	poço	N	N	N	N	N	N	
		lago	N	N	N	N	N	N	
	solo	lago 1	N	N	N	S	N	N	N
		lago 2	N	N	N	S	N	N	N
F	água	aguada 1	N	N	N	N	N	N	
		aguada 2	S	N	N	N	N	N	P
		aguada 3	N	N	N	N	N	N	
		poço	N	N	N	N	N	N	
	solo	aguada 1	C	N	N	N	N	N	
aguada 2		N	N	N	N	N	N		
H	água	aguada 1	N	N	N	N	N	N	
		aguada 1	N	N	N	N	N	N	
	solo	aguada 2	N	N	N	N	N	N	
		aguada 3	C	N	N	N	N	N	

F: filtrado; ATB: meio EMJH com antibiótico; Repique ATB: passagem de uma alíquota do tubo ATB 24 horas depois do cultivo em meio EMJH sem antibiótico; D: diluições (0-puro, 1 e 2); N: negativo; C: contaminado; S: suspeito; P: positivo.

Dos nove *pools* de urinas dos rebanhos A, C, F e H analisados por PCR, confirmou-se a presença de DNA de *Leptospira* spp. apenas no *pool* de urinas de ovinos da propriedade H, onde se observou banda com 331 pb para *Leptospira* spp. Nenhum *pool* de amostras de urina dos bovinos das propriedades apresentou formação de banda na PCR.

A amostra de número 2 da figura 1 corresponde ao isolado de águas de superfície da propriedade F, confirmando tratar-se de uma estirpe de *Leptospira* spp.

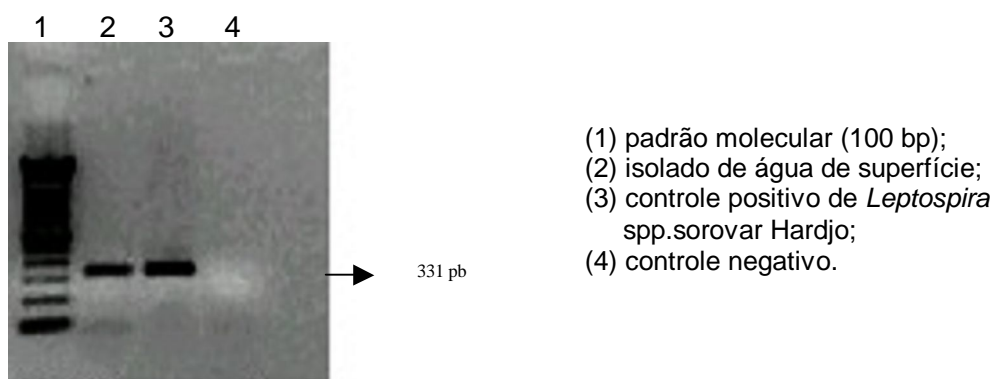


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose da estirpe isolada de águas de superfície da propriedade F. São Paulo, 2008

As observações climáticas referiam-se à cidade de Piedade – SP, como representante da região de Sorocaba. O índice pluviométrico médio, temperaturas máxima e mínima dos meses encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Observações termo-pluviométricas da cidade de Piedade – SP. São Paulo, 2008.

MÊS/ANO	PLUVIOMETRIA CHUVA (mm)	TEMPERATURA	
		MÉDIA MÁXIMA	MÉDIA MÍNIMA
JANEIRO/07	205,0	27,0	18,2
FEVEREIRO/07	92,0	29,3	18,0
MARÇO/07	57,8	30,3	17,5
ABRIL/07	19,0	26,8	17,3
MAIO/07	63,7	21,8	12,1
JUNHO/07	28,0	25,3	10,2
JULHO/07	164,0	21,6	9,7
AGOSTO/07*	0	15	11,55
SETEMBRO/07	12	27,9	14,12
OUTUBRO/07	65	26,35	15,5
NOVEMBRO/07	110	25,3	15,4
DEZEMBRO/07	245,1	27,3	16,5
JANEIRO/08	190	25,11	17,06
FEVEREIRO/08**	50,4	26,9	16,8
MARÇO/08	156,4	26,8	16,8
ABRIL/08***	85,5	23,4	15,3
MAIO/08	93,0	21,3	11,2
JUNHO/08	60,0	21,7	11,5
JULHO/08	0,0	24,3	9,1
AGOSTO/08	66,0	23,3	12,4
SETEMBRO/08***	64,0	22,3	12,3

Fonte: www.ciiagro.sp.gov.br, acesso agosto de 2008.

* colheita da amostragem sorológica dos oito rebanhos

** colheita sorológica do total de animais adultos para estudo de prevalência;

*** colheita de amostras de solo e águas no mês de abril e análise da permeabilidade nas pastagens das propriedades.

A tabela 8 apresenta os valores de pH das águas de superfície das propriedades A, C, F e H.

Tabela 8. Valores de pH de águas superfície colhidas nas propriedades A, C, F e H da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Propriedade	Ponto da análise	pH
A	Várzea	7,0
	Bebedouro	7,0
C	Lago 1	4,0
	Lago 2	4,0
	Lago 3	4,0
F	Aguada 1	6,0
	Aguada 2	6,0
	Aguada 3	6,0
H	Aguada 1	6,0
	Aguada 2	6,0
	Aguada 3	6,0

Tabela 9. Análise do índice de matéria orgânica, nutrientes e pH do solo nas propriedades A, C, F e H da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

DETERMINAÇÕES			AMOSTRAS DE SOLO				
Sigla	Descrição	Unidade	A	C1*	C2*	F	H
M.O.	Matéria orgânica	g/dm ³	39	35	38	63	24
pH	Solução CaCl ₂		4,8	4,5	4,7	5,9	6,8
V	Saturação de bases	%	62	38	49	90	96
P	Fósforo resina	mg/dm ³	14	5	7	691	9
K	Potássio	mmol _c /dm ³	3,1	2,0	3,7	5,9	2,3
Ca	Cálcio	mmol _c /dm ³	47	21	39	144	152
Mg	Magnésio	mmol _c /dm ³	7	6	12	27	86
Na	Sódio	mmol _c /dm ³					
Al	Alumínio	mmol _c /dm ³					
H+Al	Ac. potencial	mmol _c /dm ³	34	47	47	20	10
S.B.	Soma bases	mmol _c /dm ³	57,1	29,0	45,7	176,9	250,3
CTC	Capacidade de Troca Catiônica	mmol _c /dm ³	91,4	76,0	92,7	197,1	260,0
S	Enxofre	mg/dm ³					
B	Boro	mg/dm ³	0,20	0,22	0,25	0,45	0,07
Cu	Cobre	mg/dm ³	0,7	1,1	1,2	8,4	2,0
Fé	Ferro	mg/dm ³	82	85	109	79	16
Mn	Manganês	mg/dm ³	13,4	4,6	3,4	30,7	28,7
Zn	Zinco	mg/dm ³	2,3	0,6	1,0	17,0	0,6

* na propriedade C foram realizadas duas colheitas em virtude da propriedade disponibilizar dois pastos para o rebanho.

Nas propriedades foi medida a permeabilidade (infiltrações) no mês de abril/2008, considerada época chuvosa e em setembro/2008, considerada estiagem, conforme estão dispostas na tabela 10. A análise granulométrica das propriedades encontra-se na tabela 11, onde se mostra a textura de cada solo das propriedades.

Tabela 10. Índices de infiltração (permeabilidade) no solo das propriedades selecionadas na época das chuvas (abril) e da estiagem (setembro). São Paulo, 2008.

Propriedade	Época	Local	Infiltração 1	Infiltração 2	Infiltração 3	Infiltração 4	Infiltração 5	Infiltração 6	Infiltração 7	Infiltração 8	Média (mm/hora)	DP	CV
A	abril	Pasto	30,07	45,11	37,59	45,11	67,66	45,11	30,07	45,11	43,23	11,89	27,50
	setembro	30,07	45,11	37,59	45,11	67,66	NR	NR	NR	NR	45,11	14,06	31,18
C	abril	Pasto C1	60,14	34,58	60,14	60,14	52,62	NR	NR	NR	53,52	11,08	20,70
	setembro		1143	421	45,11	300,7	15,04	NR	NR	NR	384,97	456,99	118,71
	abril	Praça central C2	160,9	105,2	67,66	75,18	52,62	NR	NR	NR	92,31	42,86	46,43
	setembro		18,79	300,7	601,4	240,6	1022	NR	NR	NR	436,70	387,72	88,78
F	abril	Pasto gramado	60,14	75,18	75,18	75,18	NR	NR	NR	NR	71,42	7,52	10,53
	setembro		120,3	37,59	8,42	37,59	30,07	NR	NR	NR	46,79	42,79	91,45
H	abril	Pasto gramado	30,07	15,04	30,07	30,07	15,04	NR	NR	NR	24,06	8,23	34,22
	setembro		37,59	30,07	22,55	45,11	30,07	NR	NR	NR	33,08	8,57	25,92

Tabela 11. Análise granulométrica das amostras de solo das propriedades e seu tipo predominante de textura do solo. São Paulo, 2008.

Identificação	Areia (%)								Classificação textural
	Argila (%) < 0,002 mm	Silte (%) 0,053 - 0,002 mm	Areia total 2,00 - 0,053 mm	Areia muito grossa 2,00 - 1,00 mm	Areia grossa 1,00 - 0,50 mm	Areia média 0,50 - 0,210 mm	Areia fina 0,210 - 0,105 mm	Areia muito fina 0,105 - 0,053, mm	
Propriedade A	21,4	21,1	57,4	12,0	10,4	15,1	13,8	6,2	Franco-argiloarenosa
Propriedade C-amostra 1	55,6	10,4	33,9	2,3	9,5	12,1	7,4	2,6	Argila
Propriedade C-amostra 2	51,1	13,1	35,9	2,6	7,2	13,6	9,3	3,2	Argila
Propriedade F	21,8	19,1	59,1	7,9	14,0	21,5	11,9	3,9	Franco-argiloarenosa
Propriedade H	24,3	55,3	20,4	3,0	3,6	3,9	6,8	3,1	Franco-siltosa

Pela análise granulométrica observou-se que na propriedade A, a textura de solo é franco argilo-arenosa (transição entre argila e areia). As duas amostras colhidas da propriedade C apresentaram textura do tipo argila. A propriedade F possui solo do tipo franco argilo-arenosa, semelhante ao da propriedade A. A propriedade H possui solo com textura do tipo franco-siltosa.

6. DISCUSSÃO

Dentre as principais enfermidades reprodutivas que impactam os índices produtivos na ovinocultura destacam-se a brucelose, clamidífilose, campilobacteriose, micoplasmoses e Maedi-Visna, as quais estavam ausentes nas criações investigadas e, portanto, sem interferir nas taxas de nascimento dos animais, conforme obtido em resposta aos questionários. Neospora e pestivírus estavam presentes em rebanhos consorciados do que em exclusivos de ovinos. Toxoplasmose, assim como a leptospirose estava presente em todas as condições criatórias. O exame de OPG revelou infestação parasitária em 7/8 rebanhos investigados (Apêndice), mesmo diante do uso da vermifugação relatada na maioria das propriedades. Isto indica que animais podem estar suscetíveis a outras infecções, quando seu índice para OPG está acima de 500, onde a vermifugação se faz obrigatória (JENO e GONÇALVES, 1998).

Entretanto, a presença da leptospirose em 100% (8/8) dos rebanhos (Tabela 2) poderia acarretar perdas por abortamento e/ou infertilidade de acordo com o sorovar prevalente. Em rebanhos bovinos com prevalência para Hardjo, independente da aptidão, os sinais clínicos são abortamentos, natimortos e nascimento de animais fracos (ELLIS, 1984; DHALIWAL *et al.* 1996 a e b) os quais não foram relatados nos rebanhos investigados.

Pela tabela 3 verifica-se que no total de animais examinados houve elevada frequência de reagentes para *Leptospira* spp., 51,16% (22/43) em bovinos e ovinos consorciados e 70,83% (17/24) em ovinos ($p=0,191$). A amostragem realizada nos rebanhos apontou o sorovar Hardjo como o mais freqüente, 5/8 rebanhos apresentavam pelo menos um animal sororeagente para este sorovar (Tabela 2) sendo, entretanto todos eles consorciados com bovinos. Na amostragem dos rebanhos exclusivos de ovinos, observou-se que nenhum animal foi sororeagente para o sorovar Hardjo, sugerindo que a presença deste sorovar estava condicionada à consorciação com bovinos (Tabela 4). Gregory *et al.*, (2007) em inquérito sorológico realizado na mesma região, nas cidades de Itu, Piedade e Ibiúna verificaram que 4,9% (8/161) fêmeas ovinas originárias de sete rebanhos apresentaram reação cruzada Hardjo–Wolffi como prevalente, não sendo citada a consorciação com bovinos.

Analisando-se o principal fator de risco para o aparecimento do sorovar Hardjo, observa-se com significância estatística ($p < 0,05$) o fato de ovinos estarem consorciados com bovinos, tanto se considerando o total de rebanhos ($p=0,0018$) quanto o total de animais ($p=0,005$) (Tabela 4). Quando a frequência de reagentes para sorovar Hardjo em ovinos consorciados com bovinos foi comparada a ovinos criados de maneira exclusiva, esta diferença foi

significante, uma vez que nenhum ovino nesta condição apresentou-se reagente, o que comprova que bovinos são os principais mantenedores do sorovar Hardjo e transmissores deste agente para outras espécies, principalmente ovinos que compartilham o pastejo.

Numa tentativa de se comprovar tal afirmação, os rebanhos A, C, F e H foram selecionados visando a identificação de estirpes circulantes nas duas condições criatórias, por meio do estudo de prevalência, testando-se sorologicamente a totalidade dos animais adultos (Tabela 5) e do cultivo de urina para isolamento de leptospiros. Verificou-se que realmente a presença do sorovar Hardjo estava diretamente envolvido com o pastejo consorciado com bovinos, independentemente da existência de outros fatores de risco à infecção por leptospiros, tais como os manejos zootécnico e sanitário e as condições ambientais (Tabela 4). Ellis (1984) considera que o aparecimento do sorovar Hardjo ocorre independentemente de períodos de chuvas, o que confirma as observações deste trabalho. Pritchard *et al.* (1989) mostraram por meio de sorologia diagnóstica, que entre outros fatores de risco, a probabilidade de infecção de bovinos pelo sorovar Hardjo estava aumentada diante do acesso a rios, mananciais, pastagens consorciadas com ovinos. Bennet (1991), por meio de questionários, obtiveram correlação significativa ($p < 0,01$) quanto à presença de leptospirose pelo sorovar Hardjo apenas em rebanhos leiteiros que tinha acesso a rios e mananciais de águas, sendo os demais fatores muito pouco significantes.

Cousins e Robertson (1986 *apud Cousins et al.*, 1989)⁵ relataram elevada prevalência de sorovar Hardjo em ovinos que não haviam tido contato prévio com bovinos, e que apresentavam leptospiúria por até onze meses pós infecção, o que sugeria a transmissão ativa entre ovinos, apontando esta espécie também como mantenedora do sorovar Hardjo. Gerritsen, Koopmans e Olyhoek (1994b) indicaram o ovino como reservatório do sorovar Hardjo para os bovinos, baseados na capacidade de transmissão de ovinos para bezerras. No entanto, os ovinos transmissores de Hardjo eram oriundos de rebanhos de bovinos leiteiros, que tiveram histórico de infecção por Hardjo (Hardjobovis). No presente estudo observou-se o contrário, nos rebanhos consorciados, os bovinos seriam os transmissores para ovinos. Esta afirmação é comprovada pela presença de Hardjo exclusivamente nessas condições.

Este dado é de grande importância, pois o sorovar Hardjo é o prevalente nos rebanhos bovinos brasileiros, o que justificaria a sua presença nos rebanhos ovinos consorciados por conta da criação mista.

Além do sorovar Hardjo ou a reação cruzada com Wolffi, presentes no rebanho consorciado F em 66,67% (6/9) dos animais, no rebanho H o sorovar Icterohaemorrhagiae foi

⁵ COUSINS, D.V.; ROBERTSON, G.M. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p. 36, 1986.

identificado pela SAM em 38,10% (8/21) dos animais; mas ainda assim houve a presença de Hardjo em quatro animais do total de reagentes.

Herrmann *et al.* (2004) observaram em ovinos do Rio Grande do Sul, 34,26% (466/1.360) foram reagentes para *Leptospira* spp., onde o sorovar Hardjo foi prevalente em 210 (28,4%), suspeitando do convívio com bovinos pela alimentação de cordeiros com leite de vaca ou compartilhando as mesmas pastagens, semelhante ao verificado nos rebanhos D, E, F, G e H consorciados.

Deve-se considerar que, quanto ao fato de *Leptospira* spp. sorovar Hardjo ter sido identificada nos rebanhos consorciados, a reação ocorreu apenas frente a gemonoespécie Hardjoprajtno, com reações cruzadas com Wolffi, sendo no entanto, negativas para Hardjobovis e Guaricura, ambas pertencentes ao sorogrupo Sejroe. Embora as estirpes Hardjoprajtno, Hardjobovis, Wolffi e Guaricura estivessem presentes na coleção de antígenos utilizados na SAM, não exclui a presença destas leptospiros, uma vez que não houve isolamento e identificação das amostras de urinas investigadas. O *pool* de urina de ovinos do rebanho H analisado pela PCR identificou a presença de DNA relativo ao gênero *Leptospira*, mas não sua espécie, sorovar ou mesmo genótipo.

O isolado de águas de superfície da propriedade F resultou numa reação inconclusiva entre os sorogrupos Australis, Djasiman, Shermani, Autumnalis e Ballum com títulos inferiores a 400. Encontra-se em curso a classificação fenotípica e genotípica pela Fiocruz–RJ, o que é de fundamental importância para o estabelecimento da estirpe circulante nos rebanhos avaliados.

No presente estudo, a distribuição da *Leptospira* spp. sorovar Hardjo parece ser independente das diferentes condições de manejo de cada propriedade, do tipo de exploração do rebanho e das práticas de reprodução, diferentemente do que citam Prescott *et al.* (1988), que apontam os rebanhos de exploração de corte como mais suscetíveis ao sorovar Hardjo do que os rebanhos leiteiros, possivelmente relacionada às diferenças de manejo.

Nota-se que nos rebanhos exclusivos de ovinos vários sorovares foram identificados pela SAM, alguns com empate em frequência e magnitude de título (Tabela 2), dificultando o estabelecimento do provável infectante. Analisando-se o perfil sorológico para os sorovares de *Leptospira* spp. (Tabelas 2 e 5) dos oito rebanhos trabalhados, denota-se que o sorovar Hardjo apresenta-se permeando os animais, e como afirmado anteriormente, dependente da presença de bovinos, enquanto que os demais sorovares parecem dependentes das exposições acidentais relativas às condições ambientais e criatórias. Verifica-se que 23,53% (4/17) bovinos dos rebanhos consorciados apresentavam títulos sorológicos para *Leptospira* spp.

O sorovar *Icterohaemorrhagiae* foi o prevalente na propriedade H, sendo este sorovar mantido por roedores, o risco de exposição é semelhante para ovinos e bovinos. Favero *et al.* (2002), no estado de São Paulo, identificaram o sorovar *Icterohaemorrhagiae* como o mais provável em 0,70% (2/284) ovinos positivos e discutem o envolvimento de roedores sinantrópicos nas criações de ovinos.

Nos levantamentos sorológicos de leptospirose em ovinos, Santa Rosa e Pestana de Castro (1963) identificaram o sorovar *Canicola* em 34% (136/400) dos ovinos positivos, o mais frequente nos rebanhos de diferentes municípios do estado de São Paulo. Na Bahia, Viegas *et al.* (1980) encontraram predominância do sorovar *Autumnalis* e Viegas (1985) do sorovar *Javanica*, o que caracterizaria distribuição regional. No Rio Grande do Sul 20,5% (9/44) dos ovinos foram reagentes para *Autumnalis* (SILVA *et al.*, 2007). Depreende-se que os ovinos apresentam resultados sorológicos dependentes de vários fatores, inclusive variações regionais, climáticas como temperatura e índices pluviométricos.

Pela tabela 7 pode-se notar que na região de Sorocaba, as temperaturas variaram entre 9,1°C-18,2°C (15,3°C), mínima, e 15°C-30,30°C (25,3°C) para máxima, mostrando-se uma região onde as temperaturas não atingem níveis extremos de frio ou calor. Henry e Johnson (1978) monitoraram o isolamento de leptospiros de um lago nos Estados Unidos em duas épocas distintas, verão (junho a setembro) e inverno (dezembro), e constataram que no lago, 1/12 amostras foram positivas no inverno, enquanto que 83/126 dos isolamentos ocorreram no verão. Deve-se, entretanto, considerar que naquele país as variações térmicas são muito distintas no verão e inverno e, portanto, com resultados diferentes.

Alves *et al.* (1996) investigando a presença de aglutininas anti-leptospiros em soros caprinos de rebanhos distribuídos em quatro microregiões da Paraíba, de clima semi-árido e tropical chuvoso, verificaram significância estatística no número de reatores nesta última microregião, onde o índice pluviométrico atingiu níveis acima de 500 mm. O mesmo foi observado por Carpio *et al.* (2000), em alpacas do Peru que apresentaram maior soroprevalência em épocas de chuvas em relação à época de seca. Mineiro *et al.* (2007) destacaram que, na soroprevalência estudada em bovinos no estado do Piauí, havia correlação positiva para a pluviometria, não ocorrendo o mesmo em relação às temperaturas na região.

A interferência da umidade e, portanto, relativa ao índice pluviométrico, deve ser analisada em relação às datas das colheitas sorológicas. A primeira colheita sorológica, relativa a amostragem inicial dos rebanhos, ocorreu entre os dias 1 e 2 de agosto/07 e portanto diante do acumulado de chuvas de 164 mm ou de um período de chuvas nos últimos três meses de 255,7 mm. As colheitas para estudo de soroprevalência ocorreram em 28 de fevereiro; 06, 10 e

18 de março/07 resultando no acumulado de 206,8 mm. No decorrer destas colheitas, caracterizou-se clima quente úmido bastante semelhantes e, portanto propício para a manutenção do foco de leptospirose.

Por outro lado, a manutenção do teor de umidade do solo depende diretamente da granulometria e conseqüentemente, da permeabilidade às águas das chuvas; ou seja, o fluxo de passagem da água relaciona-se com a textura e a composição do solo. O fluxo de água das pastagens das propriedades foi medido em duas épocas (Tabela 10), nos meses de abril e setembro de 2008. Comparando-se os dados das infiltrações, nota-se diferença apenas na propriedade C, onde a permeabilidade foi maior em setembro devido ao solo estar mais seco em virtude do menor índice pluviométrico precedente à análise e com presença de rachaduras que não devem existir quando este está úmido (VIEIRA, informação pessoal)⁶ (Tabela 7).

O tipo de solo de toda a região de Sorocaba classifica-se como argilossolo, que contém uma camada superficial de argila iluvial. Estes solos estão presentes em área montanhosas na maior parte dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e leste de São Paulo, (LEPSCH, 2002) região onde estão situadas as propriedades estudadas.

Pela análise granulométrica dos solos (Tabela 11), observou-se que as propriedades A e F possuem textura do tipo franco-argilosa, a propriedade H do tipo franco-siltosa enquanto a propriedade C do tipo argilosa. Nestas estruturas de composição mista, todas seriam condizentes com a condição úmida e necessária a manutenção de leptospiros, dependentes, portanto da interação de todas as condições ambientais e da concentração deste agente excretado pela urina dos animais infectados. Solos com orifícios menores, como os solos argilosos, possuem menor permeabilidade, porém apresentam maior retenção de água; solos com orifícios maiores, como os solos formados por areia, possuem maior permeabilidade, mas não permitem maior retenção de água (VIEIRA e CHIBA, informação pessoal)⁷.

Assim sendo, leptospiros são microrganismos dependentes do conjunto de fatores ambientais, mas principalmente do teor de umidade para a sobrevivência, o qual favorece sua manutenção e propicia o isolamento a partir de águas de superfície e solo, que deverão ainda conter nutrientes em pH adequado para a sua multiplicação e conseqüente perpetuação do ciclo de transmissão diante do susceptível.

Leptospiros excretadas pela urina ou outros materiais clínicos podem sobreviver por longos períodos em solo e água, na dependência de umidade, pH e matéria orgânica (FAINE *et al.*, 1999). Águas e solos com pH ácido apresentam baixa probabilidade de isolamento de

⁶ Dr. Sidney Rosa Vieira, Instituto Agronômico de Campinas, comunicação pessoal, dezembro de 2008.

⁷ Dr. Sidney Rosa Vieira e Dr. Márcio Chiba, Instituto Agronômico de Campinas, comunicação pessoal, agosto de 2008.

leptospiras. Na tabela 8 observa-se que as propriedades A, F e H apresentaram pH das águas de superfície dentro da faixa de sobrevivência de leptospiras, enquanto que na propriedade C, os pontos de análise de pH tiveram média de 4,0 sendo considerado um meio muito ácido e improvável para sobrevivência do agente. A análise do pH da suspensão de solo em parte foi semelhante à da água de superfície correspondente em cada propriedade, com exceção da propriedade A cujo índice de acidez médio estava abaixo do encontrado em suas amostras de água (Tabela 9). Gordon Smith e Turner (1961) analisaram o tempo e a sobrevivência de leptospiras em diferentes condições de pH (5,3 a 8,0). Estes microrganismos sobreviveram de 10 a 117 dias em pH abaixo de 7,0 e de 21 a 152 dias em pH acima de 7,0; mesmo em pH 5,3, foram capazes de sobreviver por pelo menos dez dias.

O solo é o receptáculo final de matéria orgânica composta de resíduos de origem vegetal, animal e dos produtos das transformações desses e ainda composto por microorganismos e outros agentes. Variações da quantidade depositada no solo dependem do tipo de vegetação e das condições edafoclimáticas. Além de conter grandes quantidades de carbono, nutrientes e energia, existe ainda o habitat com abundante fauna, que possui dinâmica populacional própria e a comunidade microbiana heterotrófica (FAINE *et al.*, 1999; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Este resto orgânico torna-se o húmus, a parte mais estável da matéria orgânica, que na sua forma desintegrada atinge o estado coloidal. A decomposição de restos orgânicos melhora as características físicas do solo, notadamente a permeabilidade, a porosidade e a retenção de água. O húmus é um dos componentes de maior importância na superfície do solo, onde a atividade biológica é mais intensa (LEPSCH, 2002; OLIVEIRA, 2005).

Na propriedade F (Tabela 9), onde ocorreu o isolamento da água de superfície junto ao solo, a quantidade de matéria orgânica foi superior às demais propriedades (63 g/dm³). Embora informações qualitativas desta matéria orgânica não tenham sido avaliadas, pode-se inferir que nesta propriedade, o local de pastoreio, pudesse favorecer ou permitir a sobrevivência deste microrganismo. A presença de nutrientes importantes para o desenvolvimento de leptospiras como vitaminas B1 e B12, fosfatos, cálcio, magnésio, ferro, cobre e sulfatos, os quais são adicionados ao meio de cultivo (FAINE *et al.*, 1999) poderiam ser determinantes para a sua manutenção em solo e águas de superfície.

Ferro, manganês e zinco são menos disponíveis em valores de pH acima de 7,0. Ferro, alumínio e manganês atingem níveis tóxicos em valores de pH menores que 5,0. Fósforo é menos disponível em valores altos ou baixos de pH (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Sendo o ferro um micronutriente importante para os organismos, a presença ou ausência deste nutriente para leptospiras pode determinar a sua sobrevivência no meio. Leptospiras causam hemólise

para disponibilizar ferro em situações onde há deficiência (SRITHARAN e ASUTHKAR, 2004). Comparando com os valores demonstrados na tabela 9, pode-se observar que há disposição de Ferro nos solos das propriedades A, C e F, favorecendo a permanência de leptospiros, porém não muito na H, pelo seu baixo índice.

O diagnóstico da leptospirose não é uma tarefa fácil e se baseia, principalmente, nos exames laboratoriais onde o isolamento e identificação se constituem no diagnóstico confirmatório. Contudo, o isolamento necessita da viabilidade do agente, de boa colheita e conservação de amostras e mínima interferência de contaminantes.

Da propriedade F foi possível se obter o isolamento de *Leptospira* spp. (Figura 1) de aguadas que serviam de bebida aos ovinos e bovinos que utilizavam o mesmo pasto. Apesar das amostras de solo das várias propriedades terem sido colhidas próximas das coleções de águas, não houve o isolamento de *Leptospira* spp.

A aplicação da PCR foi uma ferramenta importantíssima para a confirmação do isolado. Esta técnica é empregada com êxito a partir de qualquer material clínico e permite identificar especificamente o DNA de agentes microbianos, com elevada sensibilidade em curto tempo. Para a leptospirose, esta técnica é um instrumento fundamental quando o isolamento pode estar dificultado, principalmente na ausência de viabilidade (GENOVEZ, 2006a).

Embora a técnica da PCR detecte quantidades diminutas de DNA, seu limiar de detecção é fator limitante para a confiabilidade dos resultados (MAGAJEVISK, GIRIO, MEIRELLES, 2007; PIATTI, 2008, informação pessoal⁸).

A PCR tem sido largamente utilizada em muitos trabalhos para evidenciar a presença de leptospiros a partir de vários materiais clínicos: amostra de urina (VAN EYS *et al.*, 1989; MÉRIEN *et al.*, 1992; SMYTHE *et al.*, 2002), sêmen (HEINEMANN *et al.*, 2000; GOTTI, 2007; LILENBAUM *et al.*, 2008), materiais fetais (LANGONI *et al.*, 1999; RICHTZENHAIN *et al.*, 2002; MAGAJEVISK, GIRIO, MEIRELLES, 2007), e órgãos (SILVA *et al.*, 2007).

Da mesma forma, a PCR foi importante na detecção de DNA do *pool* de amostras de três urinas de ovinos da propriedade H, confirmando a circulação deste agente nesta espécie. Analisando-se as respostas sorológicas deste rebanho verifica-se que 1/3 bovinos foi reagente para *Leptospira* spp., especificamente para os sorovares Hardjo (100) e Shermani (400). Dos 80 ovinos, 20 foram reagentes para *Leptospira* spp., com prevalência para Icterohaemorrhagiae (Tabela 5) sendo que apenas três o foram para o sorovar Hardjo. Esta aparente divergência entre a circulação dos agentes pode ser imputada a pelo menos três fatores: a) maior

⁸ Dra. Rosa Maria Piatti, Instituto Biológico, comunicação pessoal. São Paulo, 2008.

frequência de reagentes entre os ovinos e excretores de leptospiros, não apenas do sorovar Hardjo, propiciando a maior sensibilidade de detecção; b) a diluição das leptospiros no *pool* de urinas dos bovinos constituído de apenas um reagente e provável excretor; e c) a disseminação intra-espécie ovina, a partir de um animal infectado por Hardjo.

Assim, a sobrevivência de leptospiros está relacionada ao efeito sinérgico ou antagônico resultante da interação de todos esses fatores. Estudos desta natureza ainda não estão disponíveis, mas seria de grande auxílio na interpretação de condições predisponentes para a sobrevivência de leptospiros e manutenção de ciclos da doença em um determinado habitat.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados nas condições experimentais deste trabalho pode-se concluir que:

- 1- A infecção de *Leptospira* spp. sorovar Hardjo em ovinos está diretamente envolvida com o pastejo consorciado com bovinos, independentemente da existência de outros fatores de risco.
- 2- Bovinos são os reservatórios e mantenedores de *Leptospira* spp. sorovar Hardjo e transmissores para ovinos nas condições da região estudada.
- 3- O ovino é capaz de se infectar e transmitir *Leptospira* spp. a outros ovinos.
- 4- A estrutura do solo, pH e presença de matéria orgânica são condições importantes na sobrevivência de leptospiros no ambiente, entretanto o teor de umidade é limitante para a manutenção do ciclo de transmissão.

8. REFERÊNCIAS

ADLER, B.; FAINE, S.; GORDON, L. M. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a serological test for detecting antibodies against *Leptospira interrogans* serovar hardjo in sheep. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 57, p. 414-417, 1981.

ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MORAIS, Z. M. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 11-8, 1996.

AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R.S.F.; PATH, M.R.C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 45, n. 12, 1975.

ANDRE-FONTAINE, G.; GANIERE, J.P. Short communication: new topics on leptospirosis. **Comparative Immunology, Microbiology Infectious Disease**, Great Britain, v. 13, n. 3, p. 163-168, 1990.

ARAÚJO, V.E.M.; MOREIRA, E.C.; NAVEDA, L.A.B.; SILVA, J.A.; CONTREVAS, R.L. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005.

AUSTRALIA. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. **A scientific review of leptospirosis and implications for quarantine policy**. Biosecurity Australia. 2000. Disponível em: <http://www.daff.gov.au/_data/assets/pdf_file/0006/43089/leptoreviewfinal.pdf>. Acesso em: 1 ago 2008.

BATISTA, C.S.A. **Estabelecimento da Leptospirose em infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela exposição cutânea íntegra, e com abrasões e seu potencial de transmissão ambiental**. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BENNETT, R.M. A survey of dairy farmers' decision concerning the control of leptospirosis. **Veterinary Record**, London, v. 129, p. 118, 1991.

BLACK, P.F.; CORNEY, B.G.; SMYTHE, L.D.; DOHNT, M.F.; NORRIS, M.A.; SYMONDS, M.L. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in beef cattle in central Queensland. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 79, n. 5, p. 344-348, 2001.

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

BOLIN, C.A.; ALT, D.P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 69, p. 995-1000, 2001.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6ª. ed. Brasília, 2005. 816p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/vigilancia_saude/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf> Acesso em: 1 ago 2008.

CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, v. 106, p. 55 – 60, 1986.

CARPIO, J.P.H.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAES, Z.M.; FERREIRA, F.; SAKAMOTO, S.M.; FERREIRA NETO, J.S.; PINHEIRO, S.R. Soropositividade para leptospirose em alpacas criadas no altiplano peruano, Puno, Peru. Análise de associação com o índice pluviométrico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 171-176, 2000.

CARVALHO, R.B. Potencialidades dos Mercados para os produtos derivados de caprinos e ovinos. Disponível em: <<http://www.capritec.com.br/art040521.htm>>. Acesso em: 5 mar 2007.

CASTRO, V. **Estudo da prevalência da leptospirose bovina em fêmeas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil**. 2006, 104 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo,. São Paulo, 2006.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S.S.; GOTTI, T.B.; BATISTA, C.S.A.; GENTILLI, J.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; VASCONCELLOS, S.A.; GENOVEZ, M.E. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 3-11, 2008.

CAVAZINI, N.C.; SALDANHA, G.B.; SILVA, A.S.; FERNANDES, M.B.; BADKE, M.R.T.; PIVETA, C.G. Eficiência reprodutiva de vacas com leptospirose após tratamento com sulfato de estreptomicina. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 152-159, 2008.

CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (Brasil). Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais. **Manual de Leptospirose**. 2ª. ed. Brasília, 1995. 98p.

CHAPPEL, R.J.; MILLAR, B.D.; ADLER, B; HILL, J.; JEFFERS, M.J.; JONES, R.T.; McCAUGHAN, C.J.; MEAD, L.J.; SKILBECK, N.W. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo is not a major cause of bovine abortion in Victoria. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 66, p. 330-333, 1989.

CORREA, S.H.R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A.A.; DIAS, R.A.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 3, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141395962004000300007&lng=pt&nr_m=iso>. Acesso em: 14 jul 2008.

COUSINS, D. V.; ELLIS, T. M.; PARKINSON, J.; McGLASHAN, C. H. Evidence for sheep as a maintenance host for leptospira interrogans serovar hardjo. **Veterinary Record**, London, v. 124, n. 5, p. 123-124, 1989.

DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W.A. Effect of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection on milk yield in endemically infected dairy herds. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 319-320, 1996a.

DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W.A. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 110-114, 1996b.

ELDER, J.K. The influence of environment factors on the survival of zoonotic bacterial pathogens with special reference to leptospirae. **Australian Microbiologist**, v. 7, p. 323-324, 1986.

ELDER, J.K.; McKEON, G.M.; DUNCALFE, F.; WARD, W.H.; LEUTTON, R.D. Epidemiological studies on the ecology of *Leptospira interrogans* serovar Pomona and Hardjo in Queensland. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 3, p. 501-521, 1986.

ELDER, J.K.; PEPPER, P.M.; HILL, M.W.M.; WARD, W.H. The significance of leptospiral titres associated with bovine abortion. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 62, n. 8, 1985.

ELLIS, W.A.; O'BRIEN, J.J.; CASSELLS, J. Role of cattle in the maintenance of leptospira interrogans serotype hardjo infection in Northern Ireland. **Veterinary Record**, London, v. 108, June 27, p. 555-557, 1981.

ELLIS, W.A.; NEILL, S.D.; O'BRIEN, J.J.; CASSELLS, J. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in normal fetuses removed from the uteri after slaughter. **Veterinary Record**, London, v. 110, Feb 27, p. 192-194, 1982.

ELLIS, W.A.; BRYSON, D.G.; NEILL, S.D.; McPARLAND, P.J.; MALONE, F.E. Possible involvement of leptospirae in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. **Veterinary Record**, London, v. 112, Mar 26, p. 291-293, 1983.

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

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

FAINE, S. **Guideline for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982. 171p.

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

FAVERO, A.C.M. **Estudo retrospectivo dos exames sorológicos de leptospirose realizados pelo laboratório de zoonoses bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período de 1984 a 1997**.

Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

GALTON, M.M.; MENGES, R.W.; SHOTTS, E.B.; NAHMIAS, A.J.; HEATH Jr., C.W. **Leptospirosis: Epidemiology, Clinical Manifestations in Man and Animals and Methods in Laboratory Diagnosis**. Atlanta, 1962. 77p.

GENOVEZ, M.E.; YASUDA, P.H. Avaliação da eficiência de estirpes de *Leptospira biflexa* no diagnóstico de triagem da leptospirose animal. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 399-405, 1988.

GENOVEZ, M.E.; OLIVEIRA, J.C.; CASTRO, V.; DEL FAVA, C.; FERRARI, C.I.L.; PITUCO, E.M.; SCARCELLI, E.; CARDOSO, M.V.; GRASSO, L.M.P.S.; SANTOS, S. Desempenho reprodutivo de um rebanho Nelore de criação extensiva com leptospirose endêmica: estudos preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 244-246, 2001.

GENOVEZ, M.E. Diagnóstico laboratorial de la leptospirosis animal. In: CACHIONE, R.A.; DURLACH, R.; LARGUI, O.P; MARTINO, P. **Temas de Zoonosis III**. Buenos Aires: Ed. Asociación Argentina de Zoonosis, 2006a. p. 170-182.

GENOVEZ, M.E.; CASTRO, V.; GREGORY, L.; DEL FAVA, C.; FERRARI, C.I.L.; LANÇA NETO, P.; SOUZA, M.R.; GOTTI, T.; OLIVEIRA, J.C.F.; PITUCO, E.M. Effective of *Leptospira* spp. Serovar Hardjo infection reproduction of of two beef nelore herds with diferente serological status. In: **World Buiatric Congress**, 24., 2006, Nice, FR. Nice, 2006b.

GENOVEZ, M.E.; DEL FAVA, C.; CASTRO, V.; GOTTI, T.B.; DIB, C.C.; POZZI, R.C.; ARCARO, J.R.P.; MIYASHIRO, C.; NASSAR, A.F.C.; CIRRILO, S.L. Leptospirosis outbreak in dairy cattle due to *Leptospira* spp. serovar Canicola: reproductive rates and serological profile after treatment wiht streptomycin sulfate. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 4, p. 389-393, 2006c.

GENOVEZ, M.E. Leptospirose: uma doença além da época das chuvas! **Comunicado Técnico Instituto Biológico, São Paulo, n.8**, 2007. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=8> Acesso em: 10 set 2008.

GERRITSEN, M.J.; KOOPMANS, M.J.; DEKKER, T.C.; DE JONG, M.C.; MOERMAN, A.; OLYHOEK, T. Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infective cows shedding *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 55, n. 3, p. 339-343, 1994a.

GERRITSEN, M.J.; KOOPMANS, M.J.; OLYHOEK, T. Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype hardjobovis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 55, n. 9, p. 1232-1238, 1994b.

GIORGI, W.; TERUYA, J.M.; SILVA, A.S.; GENOVEZ, M.E. Leptospirose: resultados das soroglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974/1980. **O Biológico**, São Paulo, v. 47, n. 11, p. 299-309, 1981.

GOTTI, T.B. **Avaliação de três protocolos antibióticos na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705)**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GORDON SMITH, C.E.; TURNER, L.H. The effect of pH on the survival of leptospires in water. **Bulletin World Health Organization**, New York, v. 24, p. 35-43, 1961.

GREGORY, L.; RIZZO, H.; CASTRO, V.; GENTILI, J.; MEIRA JUNIOR, E.B.S.; GENOVEZ, M.E. Leptospirose em ovinos nas regiões de Piedade, Ibiúna e Itu no Estado de São Paulo, BRASIL. In: **Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos**, 5., 2007, Mendoza. Mendoza, 2007. p. 81-82.

GUITIAN, J.; TRUMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Infertilidade and abortion among first-lactation dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 215, n. 4, p. 515-518, 1999.

HANSON, L.E.; Bovine leptospirosis. In: _____. Symposium: biological agents causing infections in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, n. 6, p. 1166-1168, 1975.

HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M.; GREGORI, F.; HIGA, Z.M.M.; VASCONCELLOS, S.A.; RICHTZEBHAUN, L.J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, p. 261-267, 2000.

HERHOLZ, C.; JEMMI, T.; STARK, K.; GRIOT, C. Patterns of animal diseases and their control. **Rivista Trimestrale di Sanità Pubblica Veterinaria**, Teramo, v. 42, n. 4, p. 295-303, 2006.

HERMANN, G.P.; LAGE, A.P.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.; RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Soroprevalência de aglutininas anti-leptospira spp. em ovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 443-448, 2004.

HERRMANN, J.L. BELLENGER, E.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 7 p. 1696-1702, 1992.

HENRY, R.A.; JOHNSON, R.C. Distribution of the genus leptospira in soil and water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.35, n.3, p. 492-499, 1978.

HENRY, R.A.; JOHNSON, R.C.; BOHLOOL, B.B.; SCHMIDT, E.L. Detection of *Leptospira* in Soil and Water by Immunofluorescence Staining. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.21, n.5, p. 953-956, 1971.

HIGGINS, R.J.; HARBOURNE, J.F.; LITTLE, T.W.A.; STEVENS, A.E. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with leptospira of the serotype Hardjo. **Veterinary Record**, London, v.107, p.307-310, 1980.

HOMEM, V.S.F.; HEINEMAN, M.B.; MORAIS, Z.M.; VIANA, M.C.B.; SILVA, S.M.; SAKAMOTO, S.M.; PINHEIRO, S.R.; VEIGA, J.B.; LAU, H.D.; QUANZ, D.; TOURRAND, J.F.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Leptospirose bovina em Uruará, município da Amazônia Oriental. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, 2000.

HOMEM, V.S.F.; HEINEMAN, M.B.; MORAIS, Z.M.; VASCONCELLOS, S.A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 2, p. 173-180, 2001.

INSTITUTO AGRONOMICO (São Paulo). Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. **Dados diários por local**. Campinas: CIIAGRO. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/dados/entrada.html>> Acesso em: 17 set 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.. v. 34. 62p. . Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 1 mar 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006: Resultados Preliminares**. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. 141 p. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 1 mar 2007.

JULIANO, R.S.; CHAVES, N.S.T.; SANTOS, C.A.; RAMOS, L.S.; SANTOS, H.Q.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; CORREA FILHO, R.A.C. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 857-862, 2000.

KARASEVA, E.V. Ecological features of mammal-carriers of leptospire (*L. grippotyphosa*) and their role in natural foci leptospirosis. **Fauna and Ecology of the Rodents**, v. 10, p. 30-144, 1971.

LAGE, A.P.; LEITE, M.R.H.; THOMPSON, J.A.; BANDEIRA, D.A.; HERRMANN, G.P.; MOREIRA, E.C.; GONÇALVES, V.S.P. Serology of *Leptospira* sp. in cattle of state of Paraíba, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 185-190, 2007.

LANGONI, H.; MARINHO, M.; BALDANI, S.; DA SILVA, A .V.; CABRAL, K. G.; DA SILVA, E. D. Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em soros ovinos do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutinação em placa e soroaglutinação microscópica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 264-268, 1995.

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

LEONARD, N.; MEE, J.F.; SNIJDERS, S.; MACKIE, D. Prevalence of antibodies of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in bulk tank milk from unvaccinated Irish dairy herds. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 57, n. 4, p. 226-231, 2004.

LEPSCH, I. F. **Formação e Conservação dos Solos**. São Paulo: Ed. Oficina de Textos. 2002. 178p.

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

LILENBAUM, W.; DOS SANTOS, M.R. Effect of management systems on the prevalence of bovine leptospirosis. **Veterinary Record**, v. 138, n.23, June 8, p. 570-571, 1996. [Short Communications]

LILENBAUM, W.; DOS SANTOS, M.R. Leptospirosis in animal reproduction: III. Role of the Hardjo serovar in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 37, n. 2, p. 87-92, 1995.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F.Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S.A. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 837-842, 2008.

MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; PUTT, N. Frequência de aglutininas anti-leptospira em bovinos de corte da região sul de cerrado do estado do Mato Grosso. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p. 245-249, 1980.

MADRUGA, C.R.; DIEDERICHSEN, W.; SCHENK, M.A.M. Efeito da infecção natural da *Leptospira interrogans* sobre o desempenho reprodutivo de vacas Nelore. **Comunicado Técnico Embrapa Gado de Corte**, n. 15, 1982.

MAGAJEVISK, F.S.; GIRIO, R.J.S.; MEIRELLES, R.B. Pesquisa de *Leptospira* em fetos de vacas abatidas no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2 p. 67-72, 2007.

MARCHIORI FILHO, M. **Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira* spp. sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe da via de inoculação e da vacinação.** 2007. 131f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARTINS, L.S. **Situação epidemiológica da leptospirose bovina, canina e humana na área rural do município de Pirassununga – SP.** 2005. 79f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MEDEIROS, J. X.; SANO, E. E.; RIBEIRO, J. B. L. Cenário mercadológico da ovinocultura. In: **Simpósio Mineiro De Ovinocultura**, 4., 2005, Lavras. Lavras, 2005. p. 2-5.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SANINT-GIRONS, T. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 2219-2224, 1992.

MILLER, D.A.; WILSON, M.K.; BERAN, G.W. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, n. 11. p. 1761-1765, 1991.

MINEIRO, A.L.B.B.; BEZERRA, E.E.A.; VASCONCELLOS, S.A.; COSTA, F.A.L.; MACEDO, N.A. Infecção por leptospiros em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5 p. 1103-1109, 2007.

MOREIRA, E.C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospirose em bovinos leiteiros**. 1994, 94p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002. 626p.

MOREY, R.E.; GALLOWAY, R.L.; BRAGG, S.L.; STEIGERWALT, A.G.; MAYER, L.W.; LEVETT, P.N. Species-Specific Identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA Gene Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3510–3516, 2006.

NOGUSHI, H. The survival of *Leptospira* (Spirochaeta) *icterohaemorrhagiae* in nature: Observations concerning microchemical reactions and intermediary hosts. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 27, p. 609-625, 1918.

OLIVEIRA, J.B. **Pedologia Aplicada**. 2ª ed. São Paulo: Ed. FEALQ, 2005. 574p.

PAULA, E.V. Leptospirose Humana: uma análise climato-geográfica de sua manifestação no Brasil, Paraná e Curitiba. In: **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, 12., 2005, Goiânia, Brasil. **Anais**. Goiânia: INPE, 2005. p. 2301-2308.

PELLEGRIN, A.O.; GUIMARÃES, P.H.S.; SERENO, J.R.B.; FIGUEIREDO, J.P.; LAGE, A.P.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.C. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal matogrossense. **Comunicado Técnico EMBRAPA Pantanal**, n. 22, p. 1-9, 1999.

PRESCOTT, J.F.; MILLER, R.B.; NICHOLSON, V.M.; MARTIN, S.W.; LESNICK, T. Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 52, p. 210-215, 1988.

PRITCHARD, G. C. ALLSOP, N. J., PENNYCOT, T. W. , PALMER, N. M. A., WOOLLEY, J. C.; RICHARDS, M. S. Analysis of risk factors for infection of cattle herds with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Proceedings of the Society for Epidemiology and Preventive Medicine**, University of Exeter, Devon, UK, p. 130-138. 1989.

PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Ed. Roca, 2005. 513p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas pelas *Leptospiras spp.* In: _____. **Clínica Veterinária**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 874-887.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella spp.* and *Leptospira spp.* DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, p. 139-147, 2002.

ROSANOVA, C. **Fatores favoráveis e limitantes ao desenvolvimento da cadeia produtiva da ovinocaprinocultura de corte no Brasil**. Monografia (Especialista em Gestão Agroindustrial). - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SANTA ROSA, C.A.; PESTANA DE CASTRO, A.F.P. Presença de aglutininas anti-leptospira em soros de ovinos e caprinos no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 30, n. 16, p. 93-98, 1963.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C.R.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; YANAGUITA, R.M.; GIORGI, W. Two new leptospiral serovars in the hebdomadis group isolated from cattle in Brazil. **International Journal of Zoonoses**, Taipei, v. 7, p. 158-163, 1980.

SÃO PAULO (Estado).Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. **LUPA - Levantamento Censitário de Unidades de Produção Agropecuária**. Disponível em:
<<http://www.cati.sp.gov.br/Cati/servicos/lupa/lupa.shtml>> Acesso em: 15 jul 2008.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Economia e Planejamento. **Região Administrativa de Sorocaba**. São Paulo, 2003.

SILVA, E.F.; BROD, C.S.; CERQUEIRA, G.M.; BOURSCHEIDT, D.; SEYFFERT, N.; QUEIROZ, A.; SANTOS, C.S.; KO, A.I.; DELLAGSTIN, O.A. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n.1-2, p.144-149, 2007.

SLEE K.J.; McORIST, S.; SKILLBECK, N.W. Bovine abortion associated with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 60, p. 204-206, 1983.

SMITH, C.R.; KETTERER, P.J.; McGOWAN, M.R.; CORNEY, B.G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 71, n. 9, p. 290-295, 1994.

SMITH, D.J.W.; SELF, H.R.M. Observation on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 53, p. 436-444, 1955.

SMYTHE, L.D.; SMITH, I.L.; SMITH, G.A.; DONHT, M.F.; SYMONDS, M.L.; BARNETT, L.J.; McKAY, D.B. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 13, p. 1-7, 2002. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/2/13>>. Acesso em: 21 fev 2008.

SRITHARAN, M.; ASUTHKAR, S. Iron-regulated proteins (irps) of *Leptospira biflexa* serovar Patoc strain Patoc I. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Pondicherry, v. 22, n. 2, p. 92-96, 2004.

STONNER, H.G. Leptospiral abortion of beef cattle caused by *Leptospira Pomona* and *Leptospira hardjo*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 11, n. 8, p. 1087-1090, 1967.

SULLIVAN, N. D. The history of *Leptospira Hardjo*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 46, p. 125, April, 1970.

TEBRUGGE, L.; DREYER, T. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* associated with bovine abortion in South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, Pretoria, v. 52, p. 51-52, 1985.

THIERMANN, A.B. Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, n. 12, p. 2244-2245, 1983.

TOMICH, R.G.P.; BONFIM, M.R.Q.; KOURY, M.C.; PELLEGRIN, A.L.; PELLEGRIN, L.A.; KO, A.I.; STANCIOLI, E.F.B. Leptospirosis serosurvey in bovines from brazilian pantanal using Igg ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 674-680, 2007

TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLEN, P.; HAAKE, D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. Research article. **International Microbiology**, Madrid, v. 7, p. 35-40, 2004.

TURNER, L.H. Leptospirosis II Serology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 62, p. 880-889, 1970.

UENO, H; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4ª ed. Japan International Cooperation Agency, 1998. 143p.

VAN EYS, G.J.J.M.; GRAVEKAMP, C.; GERRITSEN, M.J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M.T.E.; TER SCHEGGET, J.; TERPSTRA, W.J. Detection of Leptospire in urine by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 10, p. 2258-2262, 1989.

VAN RAIJ, B.; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M.E.; LOPES, A.S.; BATAGLIA, O.G. **Análise Química do Solo para fins de Fertilidade**. São Paulo: Fundação Cargill, 1987. 170p.

VASCONCELLOS, S.A. Diagnóstico laboratorial de leptospirose. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 189-195, 1979.

VASCONCELLOS, S.A.; OLIVEIRA, J. C.F.; MORAIS, Z.M.; BARUSELLI, P.S.; AMARAL, R.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; SCHÖNBERG, A.; HARTSKEERL, R.A. Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 298-300, 1998.

VIEGAS, E.A.; VIEGAS, S.A.R.A.; CALDAS, E.M. Aglutininas anti-leptospira em hemo-soro de caprinos e ovinos no estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, Salvador, v. 5, n.1, p. 20-34, 1980.

VIEGAS, E.A.; **Estudos de novos sorotipos de leptospiras apatogênicas na prova de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico de leptospirose caprina e ovina**. São Paulo. 1985. 63 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

VIEGAS, S.A. R. A.; CALDAS, E. M.; OLIVEIRA, E. M. D. Aglutininas anti-leptospira em hemossoro de animais domésticos de diferentes espécies, no Estado da Bahia, 1997/1999. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 1, p. 1-6, 2001.

VIEIRA, S.R. Permeâmetro: novo aliado na avaliação de manejo de solo. **O Agrônomo**, Campinas, v.47/50 (único), p. 1-32, 1995/1998.

WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. **Sorocaba**. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Sorocaba>>. Acesso em: 23 mai 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. Malta, 2003. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf><http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf> Acesso em: 06 fev 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of a WHO expert group. Current problems in leptospirosis research. **World Health Organization Technical Report Series**, Geneva, n. 380, p. 1-32, 1967.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO recommended standards and strategies for surveillance, prevention and control of communicable diseases**. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/diseases/Leptospirosissurveillance.pdf>> Acesso em: 06 fev 2008.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, K. R.; SULZER A. F.; KAUFMANN, F. R.; BRENNER D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 407-415, 1987.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663p.

ANEXO

QUESTIONÁRIO APLICADO PARA CADA REBANHO

OBS: No caso dos rebanhos com associação bovino e ovino, o questionário foi aplicado a cada espécie animal.

PROPRIEDADE:
PROPRIETÁRIO:
LOCALIDADE:
ENDEREÇO:

DADOS DA PROPRIEDADE

Topografia:
Área:

INFRA-ESTRUTURA DA PROPRIEDADE
a. balança sim () não ()
b. baias para animais de exposição sim () não ()
c. centro de manejo sim () não ()
mangueira sim () não ()
pedilúvio sim () não ()
tronco sim () não ()
d. cocho de sal mineral sim () não ()
e. cerca de boa qualidade sim () não ()
f. energia elétrica sim () não ()
h. água encanada sim () não ()
i. sala para ração sim () não ()
Existe apoio técnico? (zootecnista, veterinário, agrônomo, etc)
não () sim () Qual?
O funcionário recebeu algum treinamento?
Sim () Não ()
1. Há quanto tempo cria ovinos?
() menos de 1 ano
() De 1 a 3 anos
() De 3 a 5 anos
() Mais de 5 anos
Número de cabeças no rebanho:
Número de matrizes do rebanho:
Número de reprodutores do rebanho:
Quais as raças que compõem o rebanho?

Qual o sistema de criação?
a-Extensivo ()
b-Semi-intensivo ()
c-Intensivo ()
Tipo de exploração econômica
a. cria
b. venda de matrizes
c. venda de reprodutores
d. venda de embriões
e. abate
f. leilões
Qual é o tipo do rebanho?
a. rebanho comercial
b. rebanho elite
c. rebanho comercial/elite
d. outro (especificar)
Qual a importância da ovinocultura na propriedade?
a. atividade principal ()
b. atividade complementar ()
Existem outras atividades exercidas na propriedade?
Não () Sim () Quais, especificar ? (caprinocultura, bovinocultura, suinocultura, cana de açúcar, outras)

MANEJOS

Rebanho
a. numero de animais/hectare
b. taxas de prenhez
c. taxas de parição
d. taxas de cria
e. taxa de descarte
Procedência do rebanho:
a. origem dos animais:
b. rebanho fechado:
c. compra importado/país de origem:
d. compra nacional () leilão () outras propriedades
Alimentação
a. pasto de boa qualidade sim () não () qual
b. uso de ração sim () não ()
c. acesso a água
c.1. bebedouros sim () não ()

OUTROS				
Vacinas empregadas				
Brucelose sim () não () Época:				
Febre aftosa sim () não () Época:				
Leptospirose sim () não () Época:				
Carbúnculo sim () não () Época:				
IBR/IPV e BVD sim () não () Época:				
Outras sim () não () Época:				
Alimentação empregada				
a. Pastagem sim () não () (tipo)				
b. Suplementação sim () não ()				
c. Mineralização sim () não ()				
d. Tipo de armazenagem da ração sim () não () qual?				
Pastagem				
a. pasto com áreas alagadiças? sim () não ()				
b. aluguel de pastos? sim () não ()				
c. uso de pastos compartilhados? sim () não ()				
e. Acesso rodoviário sim () não ()				
f. há outras criações próximas da propriedade? Sim () não ()				
g. Presença de roedores sim () não ()				
h. Presença de animais silvestres sim () não () quais? (capivara, cervídeos, cachorro do mato, pequenos roedores)				

CLÍNICA

Descrição do problema:		
Numero de animais acometidos:		
Foram acometidos inicialmente animais: residentes sim () não () introduzidos sim () não ()		
Participou de algum tipo de exposição, feira, leilão? sim () não () Quando?		
Anamnese: Escore Sim (1 a 10) Não (0)		
Sinais clínicos	Ovinos	Bovinos
Aborto		
Idade da fêmea		
Fase da gestação		

Os abortos são esporádicos ou em surtos?		
Há sazonalidade?		
São repetidos no mesmo animal?		
Ocorre retenção de placenta?		
Verifica-se a presença de metrite?		
Há presença de muco: seroso, hemorrágico, purulento, outro tipo?		
Com odor?		
A vagina apresenta-se áspera ou enrugada?		
Verificam-se vesículas na vulva?		
Infertilidade		
Nascimento prematuro		
Natimortos		
Taxa de retorno de cio		
Nascimento de animais fracos		
Anomalias congênitas		
Anemia		
Há animais com orquite ou orquiepididimite ou balanopostite?		
Existem animais com problemas articulares?		
Existem animais com urina escura (hematuria)?		
Existem animais com diarreia?		
Existem animais com tosse?		
Existem animais com corrimentos oculares e nasais?		
Febre		
Depressão, malícia, fraqueza		
Mamite		
Leite com alteração de cor		
Convulsão		
Conjuntivite		
Hemorragia		

APENDICE

PERFIL SANITÁRIO DOS REBANHOS AVALIADOS

A consorciação de bovinos e ovinos como sistema integrado e de aproveitamento de manejo zootécnico trouxe consigo a preocupação da somatória de enfermidades que estariam limitadas a uma ou outra espécie ou com possível transmissão entre espécies. Com o intuito de se excluir interferência das enfermidades reprodutivas nos dados de produtividade dos rebanhos onde foi estudado o papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose causada pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo, identificando os fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos, foi estabelecido previamente o perfil sanitário de oito rebanhos, realizando-se o diagnóstico diferencial para brucelose, leptospirose, clamidofilose, campilobacteriose genital bovina, micoplasmoses, Maed-Visna, pestivírus (Vírus da Diarréia Viral Bovina - BVDV), toxoplasmose e neosporose, e ainda o nível de parasitismo.

Foram realizados exames em 10% de amostras de soro, fezes e secreção cérvico-vaginal. Nos sorodiagnósticos foram empregadas os teste de: antígeno acidificado tamponado (AAT) para brucelose (ALTON *et al.*, 1988), reação de soroaglutinação microscópica (SAM) com identificação do provável sorovar infectante de *Leptospira* spp. para leptospirose (FAINE *et al.*, 1999); reação de fixação do complemento (FC) para clamidofilose (DONN *et al.*, 1997); reação de imunodifusão em agar gel (IDGA) para Maed-Visna (CUTLIP, JACKSON, LAIRD, 1977); vírusneutralização para pestivírus (OIE, 2007); imunofluorescência indireta (IFI) para toxoplasmose (CAMARGO, 1974) e neosporose (PARÉ, HIETALA, THURMOND, 1995). Os diagnósticos de campilobacteriose genital bovina (GENOVEZ *et al.*, 1989) e micoplasmoses (CARDOSO *et al.*, 2001) foram realizados pelo exame bacteriológico. Amostras de fezes foram submetidas à contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (GORDON e WHITLOCK, 1939) e coprocultura (ROBERTS e O'SULLIVAN, 1950) para identificação das espécies de endoparasitas.

Foram avaliados 57 ovinos entre rebanhos de criação exclusiva e consorciada e 10 bovinos provenientes de oito propriedades: três de criação exclusiva e cinco de consorciamento com bovinos. Os animais do sistema consorciado, por compartilharem pastos e manejo, foram considerados como um único rebanho, não sendo seus resultados separados por espécie.

Interessante notar a ausência de brucelose, Maed-Visna e clamidofilose nesses rebanhos. *Leptospira* spp. estava presente em todos os rebanhos, indicando que qualquer animal está suscetível a infecção por este agente. Toxoplasmose estava presente em 7/8

rebanhos, o que também indica a suscetibilidade dos indivíduos adquirirem esta enfermidade. Em rebanhos consorciados houve a ocorrência de neosporose (4/5) e pestivírus (BVDV) (2/5) e ausência destas enfermidades nos rebanhos exclusivos de ovinos. Possivelmente os bovinos sejam portadores destes agentes e haja transmissão interespecie (Tabelas 1 e 2).

Destaca-se na tabela 3, que a frequência de neosporose foi maior em rebanhos consorciados do que em exclusivos de ovinos de forma estatisticamente significativa ($p = 0,044$). Entretanto esta afirmação merece mais estudos, uma vez que existe susceptibilidade de ambas as espécies, sendo necessária a investigação de um número maior de rebanhos e animais nesta condição.

Quanto às enfermidades bacteriológicas investigadas, em cada rebanho de criação exclusiva de ovino ou consorciada com bovino, não houve isolamento de *Campylobacter* spp., *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp.

A tabela 4 refere-se a situação dos rebanhos quanto a presença de helmintos, por meio de contagem de ovos por grama de fezes (OPG); cujas espécies de endoparasitas foram identificadas, como mostra a tabela 5.

Enfermidades onde as condições ambientais são fundamentais para a disseminação, como a leptospirose, observa-se a elevada frequência de sororeagentes, independentemente da espécie e, sobretudo, sem caracterizar um sorovar específico. Há a ausência de neosporose em ovinos é limitada aos rebanhos consorciados, entretanto, esta afirmação merece mais estudos uma vez que existe susceptibilidade de ambas as espécies. Para toxoplasmose, não houve diferença entre a consorciação de ovinos e bovinos. Para pestivírus, possivelmente os bovinos sejam portadores do agente e haja transmissão interespecie. O correto diagnóstico parasitário é essencial para qualquer abordagem sanitária nestas espécies para evitar baixa produtividade. Na pequena escala analisada, a consorciação de ovinos e bovinos parece exercer influência limitada no perfil das doenças infecciosas e parasitárias, entretanto, medidas sanitárias preventivas devem ser consideradas.

Tabela 1. Perfil sanitário quanto às enfermidades sorologicamente investigadas em cada rebanho de criação exclusiva de ovino ou consorciada com bovino da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Identificação	Condição	Brucelose ¹	Leptospirose ²	Sorovares	Clamidiofilose ³	Pesti-vírus (BVDV) ⁴	Maed-Visna ⁵	Toxoplasmose ⁶	Neosporose ⁶
A	O	0/7*	6/7	Pyrogenes (2/6)	0/7	0/7	0/8	4/7	0/7
B	O	0/6	3/6	Copenhageni (1/3) Autumnallis+Casteloni+Javanica (1/3) Pyrogenes (1/3)	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6
C	O	0/11	8/11	Autumnalis (7/8)	0/11	0/11	0/11	8/11	0/11
D	C	0/3	2/3	Javanica (1/2) Hardjo (1/2)	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3
E	C	0/6	3/6	Hardjo (2/3)	0/6	0/6	0/4	1/6	0/6
F	C	0/6	6/6	Hardjo (4/6)	0/6	1/6	0/3	4/6	2/6
G	C	0/17	3/17	Whitcombi+Sentot (1/3) Icterohaemorrhagiae (1/3) Hardjo (1/3)	0/17	0/16	0/17	9/17	3/17
H	C	0/11	8/11	Icterohaemorrhagiae (5/8) Hardjo + Wolffi (3/8)	0/11	4/11	0/7	1/11	1/11

Testes: 1- Antígeno Acidificado Tamponado; 2- SAM - Soroaglutinação Microscópica; 3- Teste de Fixação do Complemento; 4- Virusneutralização; 5-Imunodifusão em Gel de Agar; 6- Reação de Imunofluorescência Indireta. O - Criação exclusiva de Ovinos; C - Criação consorciada bovinos e ovinos. * total de reagentes sobre 10% do total de animais do rebanho.

Tabela 2. Frequência de rebanhos de criação exclusiva de ovinos e de consorciados com bovinos que apresentaram animais reagentes para as enfermidades reprodutivas, na região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Condição	Brucelose	Leptospirose	Clamidiofilose	Pesti-vírus (BVDV)	Maed-Visna	Toxoplasmose	Neosporose
Consoiciadas	0/5	5/5	0/5	2/5	0/5	4/5	4/5
Exclusivas	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3
<i>P</i>	0,464	1,000	0,143

Tabela 3. Frequência de animais de criação exclusiva de ovinos e de consorciados com bovinos que apresentaram animais reagentes para as enfermidades reprodutivas, na região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Condição	Brucelose	Leptospirose	Clamidiofilose	Pesti-vírus (BVDV)	Maed-Visna	Toxoplasmose	Neosporose
Consoiciadas	0/43	22/43	0/43	5/43	0/43	15/43	7/43
Exclusivas	0/24	17/24	0/24	0/24	0/24	13/24	0/24
<i>P</i>	0,191	0,151	0,201	0,044

Tabela 4. Carga parasitária, pelo método de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) em cada rebanho de criação exclusiva de ovino ou consorciada com bovino da região de Sorocaba. São Paulo, 2008.

Identificação	Condição	Nº amostras*	OPG (média)	Contagem máxima	Contagem mínima	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
A	O	5	40	150	0	63,46	1,59
B	O	5	0	0	0	0,00	0
C	O	6	1.500	4.500	0	1914,94	1,28
D	C	3	300	600	0	272,01	0,91
E	C	6	600	1.150	0	482,70	0,80
F	C	3	110	250	0	108,40	0,99
G	C	18	250	700	0	280,75	1,12
H	C	12	200	1.700	0	461,29	2,31

*amostragem: 10% do total de ovinos de cada rebanho; O - Criação exclusiva de Ovinos; C - Criação consorciada bovinos e ovinos.

Tabela 5. Resultados do *status* sanitário quanto a enfermidades parasitárias pela coprocultura dos rebanhos ovinos selecionados (amostra representativa de 10% do total). São Paulo, 2007.

Rebanho	Condição	Número de animais examinados	Coprocultura	<i>Trichuris</i>	<i>Skryabinema</i>	Cestódeos	<i>Eimeria</i>
A	O	5	<i>Trichostrongylus</i> sp: 100%	N	N	Negativo	P
C	O	6	<i>Haemonchus contortus</i> : 78% <i>Oesophagostomum</i> sp: 6% <i>Ostertagia</i> sp: 4% <i>Trichostrongylus</i> sp: 2%	N	N	<i>Moniezia</i> sp	P
F	C	5	<i>Haemonchus contortus</i> : 87% <i>Trichostrongylus</i> sp: 13% <i>Strongyloides papillosus</i> +	N	N	<i>Moniezia expansa</i>	P
H	C	12	<i>Haemonchus contortus</i> : 60% <i>Trichostrongylus</i> sp: 36% <i>Ostertagia</i> sp: 3% <i>Cooperia</i> sp: 1% <i>Strongyloides papillosus</i> +	N	N	<i>Moniezia</i> sp	P

O - Criação exclusiva de Ovinos; C - Criação consorciada bovinos e ovinos; N – Negativo; P – Positivo.

REFERENCIAS

ALTON, G.G. Recent development in vaccination against bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**. V. 54 p.551-557, 1978.

CARDOSO, M. V.; GREGORY, L; TEIXEIRA, S. R.; SCARCELLI, E.; BRADÃO, F.Z.; GENOVEZ, M.E. Alterações na qualidade seminal associadas à *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* em sêmen bovino in natura. In: XIV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2001, Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2001. v. 25. p. 240-242.

CUTLIP. R.C.; JACKSON, T.A.; LAIRD, G.A. Immunodifusion test for ovine progressive pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 7, p. 1081-1084, 1977.

DONN, A.; CARNIELETTO, P.; CHIARACANE, G.; LADU, M.; MACHELL, J.; MANDOLA, M.I.; RUIU, A.; STANCANELLI, A.; TURILLI, C. Standardizzazione della tecnica di fissazione del complemento per la dimostrazione di anticorpi anti *Chlamydia* nel siero di sangue. **Anais... Il Progresso Veterinário**, v. 4, p. 125-128, 1997.

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

GENOVEZ, M.E., SCARCELLI, E., ROJAS, S. Campilobacteriose genital: proposta de diagnóstico mais sensível em touros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 56, n. 1-2, p. 5-7, 1989

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Council Science Ind. Research**, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Interpretation of an indirect antibody test for diagnosis of *Neospora* sp infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v. 7, p. 273-275, 1995.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agriculture Research**, v.1, p.99-102, 1950.

World Organization for Animal Health. (OIE). Disponível em http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00048.htm. Acesso: 02 abr 2007.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)