

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Laís Miguel Rezende

**Diagnóstico de Leptospirose bovina em duas propriedades rurais
utilizando MAT, ELISA e PCR**

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS –BRASIL
2016

Laís Miguel Rezende

**Diagnóstico de Leptospirose bovina em duas propriedades rurais
utilizando MAT, ELISA e PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias

Área de Concentração: Saúde Animal.

Orientadora: Prof. ^aDr^a. Anna Monteiro
Correia Lima.

Uberlândia –Minas Gerais- Brasil

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R467d Rezende, Laís Miguel, 1988
2016 Diagnóstico de Leptospirose bovina em duas propriedades rurais
utilizando MAT, ELISA e PCR / Laís Miguel Rezende. - 2016.
43 f. : il.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Leptospirose - Bovinos - Teses. 3. Bovino
de leite - Doenças - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

**À minha família pelos
ensinamentos, educação e por
estarem sempre do meu lado,
me apoiando.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e todos os espíritos de luz que me acompanham e nunca me abandonam, sempre dando forças para não me desviar do caminho certo e não desistir dos meus objetivos.

Á minha linda família, meus pais e minha irmã por me aguentarem nos dias ruins, me ouvirem, pelo apoio em quase todas minhas loucuras e por compreenderem minha ausência, principalmente nesta reta final.

Á minha orientadora Prof^a. Dr.^a Anna Monteiro, pela oportunidade de trabalhar com ela e no laboratório, pela paciência, dedicação, ensinamentos, ajudas financeiras que não foram poucas, indicações quentíssimas as quais sou muito grata.

Aos meus amigos LADOC, que tornaram esses dois anos e meio muito mais felizes, leves, gordos e extremamente engraçados, vocês são demais.

Em especial a minha coorientadora, Pollyanna Mafra que foi de extrema ajuda neste trabalho tanto na parte prática como na teórica, ajudando nos dias de sábado, domingo e até no meio de chuva.

Á Dayzinha e o Bruninho pela amizade, companheirismo, paciência e ajuda no trabalho.

Ao Danilo Mundim e Andreia Zago que me ajudaram em praticamente todas as coletas de material biológico, porque sem coleta não existe pesquisa, muito obrigada.

Ao meu irmão de consideração André Madeira que não tem nada a ver com essa pesquisa, mais mesmo assim me ajudou em algumas coletas de emergência.

Á Thaizinha por identificar meus eppendorfs e me ajudar a aliquotar as amostras.

Ao Veterinário Rodrigo, Divino e aos outros colaboradores da Fazenda Glória que foram de grande ajuda.

Á Mariana Assunção pela ajuda no PCR.

Aos técnicos do LADOC pela colaboração, em especial à Marílinha, pela amizade.

RESUMO

A Leptospirose é uma doença, de grande impacto econômico sobre a pecuária, além de ser uma importante zoonose que acomete várias espécies animais. Diversos sorovares podem infectar os bovinos, induzindo ou não manifestações clínicas assim sendo o diagnóstico clínico não é conclusivo, sendo necessário o auxílio dos testes de laboratório para a confirmação do diagnóstico. A Soroaglutinação Microscópica em Campo Escuro (MAT) é considerada teste padrão pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), porém apresenta algumas limitações e sua interpretação pode ser subjetiva. Outros testes de diagnóstico estão sendo desenvolvidos com o objetivo de substituí-lo ou complementá-lo, como o ELISA e o PCR. Os quais podem atuar como aliados no monitoramento dos animais, por se tratarem de testes mais sensíveis e específicos, aumentando a qualidade do procedimento diagnóstico. Objetivou-se com essa pesquisa avaliar a ocorrência da infecção em duas propriedades, com e sem histórico de leptospirose com auxílio do MAT, ELISA e PCR. Para isto foram analisados 48 bovinos voltados para produção de leite, sendo que destes, 20 (41,66%) eram reagentes no MAT apresentando títulos de anticorpos maiores ou iguais a 100, 12 amostras de urina, foram selecionadas para realização da PCR sendo todas consideradas negativas ao teste. Para complementar os resultados, três ELISAs, cada um empregando antígenos diferentes para detecção de anticorpos em soros de bovinos, sendo eles: *L.interrogans* sorovar Hardjo, *L.interrogans* sorovar Hebdomadis e um *pool* contendo seis sorovares foram desenvolvidos. Os quais obtiveram como sensibilidade 90%, 70%, 20% respectivamente e uma especificidade de 67,10%, 80,26%, 89,47%. Com exceção do ELISA/*pool*, todos alcançaram uma boa concordância com o teste padrão e uma boa reprodutibilidade. Conclui-se que é sempre importante correlacionar dois ou mais testes de diagnósticos, associado ao quadro clínico, para aumentar a eficácia dos resultados.

Palavras Chaves: Hebdomadis, *Lepstospira* spp., testes sorológicos.

ABSTRACT

Leptospirosis is a disease of great economic impact on livestock as well as being an important zoonosis that affects several animal species. Several serotypes can infect cattle, inducing or no clinical manifestations thus clinical diagnosis is inconclusive, requiring the help of laboratory tests to confirm the diagnosis. may or may not induce clinical manifestations clinical diagnosis is not conclusive, requiring support of laboratory tests to confirm the diagnosis. The Microagglutination test (MAT) is considered as standard by the World Organization for Animal Health (OIE) but has some limitations and their interpretation can be suggestive. Some tests in order to detect anti-Leptospira immunoglobulins are being developed in order to replace it or supplement it, as ELISA and PCR. They can act as allies in animal tracking, because they are more sensitive and specific tests, increasing the quality of the diagnostic procedure. The aim of this research is to evaluate the occurrence of infection in two properties, with and without history of leptospirosis with support of MAT, ELISA and PCR. For this were analyzed 48 cows, of these 20 (41.66%) were positive in MAT, with antibody titers equal or greater to 100, 12 urine samples were selected for PCR analysis are all considered negative to the test. To complement the results, three ELISAs, each employing different antigens to detect antibodies in cattle sera, these being: *L.interrogans* serovar Hardjo, *L.interrogans* serovar Hebdomadis and a pool with six serotypes have been developed. They presented as sensitivity, 90%, 70%, and 20% respectively, and a specificity of 67, 10%, 80, 26%, 89, 47%. Except the ELISA / pool, all have reached a good agreement with the standard test and good reproducibility. In conclusion, it is always important to relate two or more diagnostic tests, associated with the clinical diagnostic, to increase the effectiveness of the results.

Keywords: Hebdomadis, *Lepstospira* spp., serologic tests.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sorovares de <i>Lepstospira interrogans</i> , utilizadas no MAT, de acordo com o sorovar pertencente.	19
Tabela2 Resultados das concentrações e diluições ótimas dos reagentes para os três ELISAs 23indiretos utilizado como diagnóstico de Leptospirose bovina.....	23
Tabela 3- Resultados do MAT, com títulos de anticorpos aglutinantes anti- <i>Leptospira</i> spp. e dos ELISAs sensibilizadas com os três antígenos, para a Propriedade.....	27
Tabela 4 Resultados do MAT, com títulos de anticorpos aglutinantes anti- <i>Leptospira</i> spp. e dos ELISAs sensibilizadas com os três antígenos, para a Propriedade B.....	29
Tabela 5 Comparação dos resultados dos soros bovinos das duas propriedades entre as técnicas MAT e ELISA/ Sorovar Hardjo para detecção de anticorpos anti-leptospira, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.....	30
Tabela 6 Comparação dos resultados dos soros bovinos das duas propriedades entre as técnicas MAT e ELISA/ Sorovar Hebdomadis para detecção de anticorpos anti-leptospira, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.....	31
Tabela 7 Comparação dos resultados dos soros bovinos das duas propriedades entre as técnicas MAT e ELISA/ Pool de Sorovares para detecção de anticorpos anti-leptospira, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.-----	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de Sensibilização do ELISA indireto.....	21
Figura 2. Mapeamento da Padronização dos ELISAs indiretos para diagnóstico de Leptospirose bovina realizado nos três antígenos testados.....	22
Figura 3. Esquema da adição dos reagentes (antígeno, anticorpos primário e secundário), conforme mapeamento da Padronização do ELISA indireto para diagnóstico de Leptospirose em bovinos realizada nas três padronizações.....	23
Figura 4 Mapeamento dos resultados das concentrações e diluições ótimas dos reagentes para os três ELISAs indiretos utilizado como diagnóstico de Leptospirose bovina.....	24
Figura 5 Detecção do DNA de <i>Leptospira</i> spp na urina de bovinos com titulações maiores ou iguais a 100 no MAT e positivos nos três ELISAs.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1 Agente Etiológico	12
2.2 Patogenia, Transmissão e Sintomatologia Clínica.....	12
2.3 Leptospirose em Bovinos.....	13
2.4 Métodos Diagnósticos.....	14
2.5 Controle	16
2.6 Tratamento.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Amostras De Sangue.....	18
3.3 Amostras De Urina	18
3.4 Testes De Diagnóstico.....	18
3.4.1 Soroaglutinação em Campo Escuro (MAT).....	18
3.4.2 ELISA	19
3.4.2.1 Antígenos	19
3.4.2.2 Preparação dos Antígenos	20
3.4.2.3 Controles utilizados na Padronização.....	20
3.4.3 Padronização do ELISA indireto	20
3.4.4 Validação do ELISA indireto	23
3.5 Diagnóstico Molecular.....	25
3.5.1 Preparo das amostras para a PCR.....	25
3.5.2 Extração das amostras de urina	25
3.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	25
3.5.4 Amplificação do DNA.....	26
3.5.5 Ciclo empregado (Termociclador)	26
3.5.6 Análise do produto amplificado	26
3.5.7 Análises estatísticas	26
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Banco do Brasil (2010) estima-se que somente 2,3% das propriedades leiteiras são especializadas e atuam como empresa rural eficiente, entretanto, 90% dos produtores são considerados pequenos, com baixo volume de produção diária, baixa produtividade por animal e pouco uso de tecnologias. As doenças infectocontagiosas influenciam diretamente neste cenário nacional, já que provocam uma queda no rendimento animal e uma baixa eficiência reprodutiva.

Entre estas doenças destaca-se a leptospirose, reconhecida como um importante problema de saúde pública global, causando distúrbios reprodutivos em bovinos e outros ruminantes como, abortos, natimortos, nascimento de bezerros fracos e diminuição na produção de leite (LUPI, 2013).

Os bovinos são os hospedeiros de manutenção da sorovariedade Hardjo, portanto, apresentam a doença na forma crônica, raramente desenvolvendo sintomatologia (CHIARELI et al., 2008). Assim sendo, o diagnóstico clínico não é conclusivo, sendo necessário o auxílio de testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico (FAINE et al., 1999).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) utiliza como padrão internacional o teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro (MAT), entretanto ele possui algumas limitações: como a utilização de leptospiras vivas como抗ígenos, uma equipe treinada para a sua manutenção no laboratório e leitura do teste, a não detecção da doença na fase aguda, não é capaz de diferenciar títulos vacinais, e reações cruzadas entre os sorovares do mesmo sorovar podem ocorrer (PICARDEAU, 2013; OIE, 2006).

Devido as limitações do MAT e complexidade da sua interpretação, vários testes para detectar imunoglobulinas anti-Leptospira foram desenvolvidos com o objetivo de substituir ou complementá-lo, como o ELISA e o PCR (HAMMOND et al., 2012).

Os ensaios imunoenzimáticos têm sido desenvolvidos como métodos alternativos de triagem soroepidemiológica para a leptospirose bovina, podem-se destacar como vantagens do teste de ELISA em relação ao MAT a alta sensibilidade do teste, a facilidade de execução da análise, a capacidade de distinguir entre infecção aguda e crônica por detecção de imunoglobulinas específicas de IgM ou IgG, alta reprodutibilidade quando comparada com o MAT (FLANNERY et al., 2001).

Inversamente, dependendo do antígeno empregado, um resultado positivo no ELISA não dá nenhuma indicação sorovar / sorovar infectante e não é suficiente para diagnosticar um caso de leptospirose, deve estar sempre associado com outros testes diagnósticos (PICARDEAU, 2013).

O PCR tem sido nos últimos anos, cada vez mais utilizado para o diagnóstico da leptospirose, e até mesmo tende a substituir os métodos sorológicos em zonas endêmicas, devido à sua sensibilidade e capacidade para dar um diagnóstico precoce, pois é capaz de detectar o agente na fase de leptospiremia e não exige a presença de organismos viáveis para sua realização.

Todavia o resultado positivo no PCR revela a presença da Leptospira na amostra, porém não permite identificar diretamente qual o sorovar infectante o que é particularmente importante para os estudos epidemiológicos (LOUREIRO, 2013; PICARDEAU, 2013). O fator financeiro também deve ser considerado, pois ainda é um exame caro de se realizado e que não possui boa repetibilidade.

Para um controle eficaz de uma doença infecciosa é essencial um teste de diagnóstico viável com alta sensibilidade, especificidade e praticidade (PALANIAPPAN et al., 2007).

Nenhuma técnica de diagnóstico no momento atual é completamente satisfatória e existe a carência de um teste laboratorial para a detecção da leptospirose animal, que se enquadre nos requisitos acima citados, o que continua a ser um dos principais obstáculos ao diagnóstico e vigilância da doença em questão (HARTSKEERL et al., 2011).

Atualmente, alguns pesquisadores estão padronizando ELISAs baseados em proteína de membranas recombinantes, tais como LipL32, OmpL1, LipL41, LipL36 , por causa da concentração elevada de抗ígenos imunorreativos o que os confere uma alta sensibilidade e especificidade em torno de 85% , 97% respectivamente (HARTLEBEN et al., 2013; CHALAYON, 2011; BOMFIM et al., 2005; YAN, et al., 1999).

Entretanto, a utilização de culturas vivas de leptospirose como antígeno, são pouco pesquisadas, em razão disso seria relevante tentar padronizar um teste com os sorovar mais prevalente da região ou até mesmo um *pool* dos sorovares mais representativos, principalmente em casos onde existe um prévio conhecimento do histórico da doença na propriedade.

O MAT ainda é o teste de predileção e o mais utilizado na prática laboratorial, porém existe a necessidade de correlacionarmos ele com outros testes mais sensíveis e específicos o que segundo Brasil (2006) aumenta a qualidade do procedimento diagnóstico e diminui o número de falso-positivos.

Portanto, objetivou-se com essa pesquisa avaliar a ocorrência da infecção em duas propriedades, uma com histórico de surto de leptospirose e outra livre há pelo menos três anos, com o auxílio do MAT, ELISA e PCR, para confirmação dos animais reagentes.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Agente Etiológico

O agente etiológico da leptospirose pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*, podendo estas ser classificadas como patogênico e não patogênico, definido de acordo com a homologia do DNA, aproximadamente 250 sorovares foram reconhecidos entre os patogênicos. Antigenicamente, sorovares relacionados são agrupados em sorovares, 26 dos quais foram descrito para as estirpes patogênicas (MURRAY et al., 2013).

Cada sorovar tem predileção por um hospedeiro animal (hospedeiro de manutenção), mas pode também acometer outras espécies (hospedeiro incidental), já que esta não é uma bactéria espécie-específica (QUINN, 2005).

São bastante sensíveis à luz solar direta, aos desinfetantes comuns a aos antissépticos. O período de sobrevida das leptospires patogênicas na água varia segundo a temperatura, o pH, a salinidade e o grau de poluição. Sua multiplicação é ótima em pH compreendido entre 7,2 a 7,4.

Já foi constatada, por meio de ensaios experimentais, a persistência de leptospires viáveis em água por até 180 dias (LANGONI, 1999). No meio ambiente, sobrevivem bem em terrenos úmidos, pântanos, córregos, lagos e estábulos com excesso de umidade. São muito sensíveis ao pH ácido e à dissecação (FAINE et al., 1999).

2.2 Patogenia, Transmissão e Sintomatologia Clínica

As leptospires patogênicas rompem as barreiras teciduais penetrando por meio de abrasões na pele e mucosas, podendo atingir a corrente circulatória, onde se multiplicam e disseminam (MERI et al., 2005).

Após a penetração, as leptospiras disseminam-se pela corrente circulatória e inicia-se o processo de multiplicação no sangue e em diversos órgãos, como fígado, baço e rins. Esta fase é chamada de leptospiremia, que tem uma duração de quatro a cinco dias, raramente superando sete dias, com o progredir da infecção, ocorre a reação imunitária do hospedeiro, que antagoniza o agente e faz com que o mesmo encontre refúgio em algumas áreas do organismo onde a imunidade humoral inexiste ou é verificada em níveis baixos (FAINE et al., 1999).

Tais locais são a câmara do globo ocular e a luz dos túbulos renais. A localização renal caracteriza a fase de leptospirúria, que tem início entre o sétimo e o décimo dia da evolução da doença. Nesta fase, ocorre a formação de complexos imunes e reação inflamatória, o que leva vários órgãos a uma vasculite generalizada, principalmente no fígado, rins, coração, pulmões e sistema reprodutivo (FAINE et al., 1999).

A transmissão pode ocorrer pelo contato direto com sangue, tecidos, órgãos ou urina desses animais infectados, e também por uma via indireta, quando em contato com água, solo úmido ou vegetação contaminada. A penetração de leptospiras pode ocorrer por mucosas íntegras, na pele lesada e inclusive da pele íntegra (GUIDI, 2006; KOURY, 2006).

Nos ruminantes os problemas reprodutivos, tais como infertilidade, aumento do número de serviços por concepção, intervalo de parto prolongado, aborto, ocorrência de natimortos e descendentes fraco, são as principais sintomatologias clínicas, anorexia, febre alta, hemoglobinúria, icterícia, depressão e uremia, também podem ocorrer.

2.3 Leptospirose em Bovinos

A leptospirose bovina ocorre em todo o mundo sendo o sorovar Hardjo a estirpe adaptada a espécie, possuindo a capacidade de colonizar e persistir tanto no trato renal como no trato genital de vacas e touros infectados (ADLER, 2015).

O gênero *Leptospira* possui espécies patogênicas e não patogênicas definida de acordo com parentesco de DNA. Possuindo aproximadamente 250 sorovares patogênicos de *Leptospira* spp. e os sorovares relacionados antigenicamente foram agrupados em sorovares, 26 dos quais foram descrito para as estirpes patogênicas (MURRAY et al., 2013).

A infecção é dividida em dois grupos principais, sendo o primeiro determinado por cepas adaptadas a um hospedeiro animal no qual a infecção se caracteriza subclínica, o animal está positivo para leptospirose, eliminado o agente no meio ambiente, porém não apresenta

nenhuma sintomatologia clínica, desempenhando um importante papel epidemiológico, pois torna-se uma fonte importante de infecção para os seres humanos ou outros animais (SUEPAUL et al., 2011).

O segundo grupo consiste de infecções causadas por cepas accidentais carreadas por outros animais (domésticos ou selvagens) e são mais dependente de fatores ambientais e de práticas de manejo, onde existe o contato do animal com a urina dos reservatórios da bactéria (ELLIS, 1994).

Neste caso a infecção é aguda e incomum, normalmente associada à infecção por cepas pertencentes aos sorovares Pomona, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa, em animais jovens, onde os sinais clínicos geralmente estão associados a problemas reprodutivos; caracterizados por abortos, natimortos, terneiros fracos e infertilidade da vaca por mortalidade embrionária, e/ou uma queda brusca na produção leiteira, podendo ocasionar uma flacidez de úbere e leite de coloração semelhante ao colostro; contagem celular alta, febre e anorexia (ADLER, 2015; LEVETT, 2001).

Quando a infecção é causada por cepas accidentais, geralmente ela se apresenta em surtos, como foi recentemente descrito em pequenos ruminantes para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae (MARTINS et al., 2012; GIANGASPERO et al., 2013).

Além do Hardjo, outros sorovares que causam a infecção com certa frequência nos bovinos são a Wolffi e Pomona, contudo muitos estudos realizados no país revelam resultados diversificados incluindo sorovares que não foram, ainda, isolados desta espécie animal, tais como: Grippotyphosa, Canicola, Hebdomadis, Pyrogenes e Tarassovi (ARAÚJO et al., 2005; RIET-CORREA et al. 2001).

O sorovar Hebdomadis é frequente em animais silvestres e bovinos e a associação entre a prevalência do sorovar e sinais clínicos ainda é pouco conhecida nesses animais (BRASIL, 2006; MINEIRO, 2007; SILVA, 2015).

2.4 Métodos Diagnósticos

O diagnóstico de leptospirose pode ser necessário não só para a confirmação da doença clínica, mas também por outras razões, tais como a avaliação da infecção e/ ou o estado imunitário de um rebanho, para efeitos de um programa de controle ou erradicação; estudos epidemiológicos; e para a introdução de animais não infectados em um rebanho saudável (ADLER et al., 2015).

Os testes sorológicos são os mais amplamente utilizados para o diagnóstico da leptospirose, sendo o teste de soroaglutinação microscópica (MAT) o recomendado como padrão internacional, de acordo com o *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE, 2006).

Geralmente, são utilizadas 24 cepas representativas dos diversos sorovares de bactérias patogênicas existentes. Para isso, necessita-se da manutenção de coleções de bactérias vivas que contemplam esses sorovares. Consideram-se positivos os soros que tenham 50% de aglutinação em comparação ao controle negativo, onde não é aplicado soro (PICARDEAU, 2013).

No entanto, o MAT tem sérias limitações para o diagnóstico da infecção crônica em animais, tanto no diagnóstico de aborto, quanto na identificação de portadores renais ou genitais, onde os títulos estão caindo ou estáticos. Os animais infectados podem apresentar titulação abaixo do ponto de corte do teste que é de 1:100 (ELLIS et al., 1985; OTAKA et al., 2012; HAMOND et al., 2012).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) está sendo cada vez mais utilizando para o diagnóstico devido à sua sensibilidade, e não exigindo a presença de organismos viáveis e a sua capacidade de gerar um diagnóstico mais rápido (PICARDEAU, 2013). Outra vantagem é a possibilidade de manter as amostras congeladas até serem processadas, diferentemente da cultura onde se preconiza a utilização de amostra recém coletadas (MELO, 2010).

A PCR se torna uma ferramenta importante no diagnóstico precoce da leptospirose, pois é capaz de detectar o agente na fase de leptospiremia, ou seja, ainda na primeira fase da infecção (BROWN, 1995).

Também é descrita como uma ferramenta molecular específica e sensível para a detecção dos hospedeiros inaparentes, principais veiculadores da doença no rebanho, auxiliando em muito em um programa de controle integral da leptospirose em condições de campo, podendo abranger diferentes amostras, tais como a urina, sêmen e fluido vaginal (DIRECTOR, 2014; GAMAGE et al., 2011; HAMOND et al., 2012; LILENBAUM et al., 2008).

O ELISA baseia-se na formação de um complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac), com atividade imunológica e enzimática. Ao adicionar-se um substrato cromógeno ocorre o desenvolvimento de coloração, que pode ser mensurado com o auxílio de um espectofotômetro (MADRUGA et al., 2001).

Estão sendo utilizados como uma ferramenta de diagnóstico, traz algumas vantagens, como a capacidade de distinção entre títulos vacinais e de infecção, e através da detecção de

imunoglobulinas específicas IgM ou IgG, é capaz de diferenciar a infecção na fase aguda ou crônica da doença, possui alta sensibilidade e especificidade e alta repetibilidade quando comparado com o MAT(FLANNERYet al., 2001)

2.5 Controle

Os métodos de controle variam de acordo com a facilidade de acesso aos animais, quantidade dos mesmos, as ferramentas disponíveis para utilização e a viabilidade econômica das condutas, e se baseiam na interrupção da transmissão direta e indireta da infecção. O controle é necessário não só para controlar a infecção em uma espécie em particular, mas também para reduzir o risco zoonótico (ADLER,2015).

Nos ruminantes, a vacinação desempenha um importante papel no controle da leptospirose, e deve ser associada a outras medidas de manejo, como; controle de roedores na propriedade, tratamento de animais doentes, e eliminação do excesso de água no ambiente (DE NARDI, 2005).

Porém muitos produtores rurais não realizam a vacinação do rebanho ou então não seguem o calendário corretamente, onde deveriam revacinar os animais a cada seis meses.

Embora a vacinação diminua a gravidade da doença, as vacinas não previnem a infecção completamente porque a imunidade é sorovar-específica e estas protegem apenas contra sorovares incluídos nos imunógenos, dessa forma, não terão cobertura vacinal os animais infectados com sorovares que não estejam incluídos (OIE, 2006). Desse modo, a elaboração de vacinas deve ser feita, com ênfase para aqueles sorovares, presentes na região (BOLIN e ALT, 2001; ARAUJOet al., 2005).

2.6 Tratamento

O tratamento de leptospirose aguda em animais ou em rebanhos é baseado no uso de antibióticos, mais o tratamento de suporte, os princípios ativos utilizados podem ser os mesmos para todas as espécies, podendo variar de acordo com a sua segurança em uma espécie em particular, a disponibilidade no comércio, o custo e a via de administração (ADLER, 2015).

Uma combinação de penicilina e estreptomicina tem sido a terapia de escolha para o tratamento de leptospirose aguda, contudo ampicilina, amoxicilina, tetraciclina, tulatromicina

e cefalosporinas de terceira geração, também têm sido utilizados (ALT et al., 2001; CORTESE et al., 2007; SMITH et al., 1997).

Para o tratamento de leptospirose renal crônica e genital, a estreptomicina a 25 mg / kg é o antibiótico mais amplamente utilizado para animais portadores renais (ADLER, 2015; HODGES et al., 1979; ELLIS et al., 1985).

Santos et al., (2001) empregaram estreptomicina para a terapia da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona. Os resultados obtidos confirmaram a atuação da estreptomicina para o controle da leptospiremia e leptospirúria em uma única aplicação na concentração de 25 mg/kg de peso corpóreo.

Nem sempre os médicos veterinários fazem um acompanhamento clínico com o auxílio de testes laboratoriais, para confirmação da doença utilizando antibióticos de amplo espectro quando se deparam com alterações reprodutivas, podendo levar a uma resistência antimicrobiana ou até mesmo induzir quadros subclínicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foi utilizado neste estudo um total de 48 vacas de produção de leiteira, oriundas de duas propriedades rurais diferentes denominadas A e B.

A propriedade denominada A, localizada no município de Uberlândia-MG, na qual se realizavam exames semestralmente não apresentava histórico da doença a pelo menos três anos.

A propriedade B localizada no município do Prata, possuía um histórico de surto de leptospirose e problemas reprodutivos, para tal estudo 24 bovinos acima de 18 meses de cada propriedade foram selecionados randomicamente. As duas propriedades possuíam histórico de vacinação.

3.2 Amostras De Sangue

As coletas foram realizadas através da venopunção da veia caudal dos bovinos, com o auxílio de tubos de coleta a vácuo estéril, e agulhas descartáveis. Após a coleta de aproximadamente cinco mL em tubos sem adição de anticoagulantes, as amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo reciclável, para o Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), LADOC-FAMEV-UFU.

Onde foram submetidas à centrifugação de 5000 rotações por minuto, por aproximadamente cinco minutos em centrífuga Excelsa Baby (centrífuga marca FANEM, modelo 206) e o soro separado em alíquotas em microtubos, previamente identificados e armazenados a - 20°C, para que posteriormente pudessem ser analisadas pelo método MAT e pelo ELISA.

3.3 Amostras de Urina

Foram coletadas 10 mL de urina por meio da micção espontânea ou massagens na região pré-pubiana, acondicionadas em tubos cônicos de 25 mL estéreis, e mantidas refrigeradas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável até a chegada no LADOC-FAMEV-UFU, onde foram aliquotadas em microtubos de 2, 5 mL, previamente identificados e armazenados a menos -86°C.

3.4 TESTES DE DIAGNÓSTICO

3.4.1 Soroaglutinação em Campo Escuro (MAT)

Para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp., as amostras de soro foram submetidas ao MAT. Segundo orientações de Brasil (1995) com leitura em microscópio (Axio Scope A.1 Carl Zeiss) depois da incubação de 1 hora a 28°C.

Os抗ígenos utilizados foram 14 diferentes sorovares patogênicos (Tabela 1).

Tabela 1 Sorovares de *Lepstospira interrogans*, utilizadas no MAT, de acordo com o sorovar pertencente.

Sorogrupos	Sorovares
Australis	Australis, Bratislava
Autumnalis	Autumnalis
Bataviae	Bataviae
Canicola	Canicola
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo, Wolffii
Tarassovi	Tarassovi

Foi considerado reagente o soro com no mínimo 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospires aglutinadas no microscópio em aumento de 100 vezes. As amostras reagentes, na triagem, foram novamente examinadas em diluições crescentes de 1:100 até 1:3200 (BRASIL, 1995).

3.4.2 ELISA

Foram realizados neste estudo três ensaios imunoenzimáticos indireto, cada um sensibilizado com um antígeno bruto diferente (culturas vivas de *L.interrogans*, sem tratamento) para detecção de anticorpos da classe IgG em amostras de soros bovinos.

3.4.2.1 Antígenos

Os抗ígenos utilizados no ELISA foram os mais prevalentes no MAT, no caso *L.interrogans* sorovar Hardjo e *L.interrogans* sorovar Hebdomadis, também foi realizado um pool contendo todos os sorovares reagentes no MAT, com adição de alguns que estavam presentes nas vacinas comerciais, utilizadas nas propriedades investigadas, totalizando seis sorovares distintos, Canicola, Hardjo, Tarassovi, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona, Hebdomadis.

3.4.2.2 Preparação dos Antígenos

Como antígenos, utilizaram-se culturas vivas de leptospiras, todos preparados a partir de matrizes mantidas Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFU, repicadas semanalmente em meio de cultura EMJH (Difco®), enriquecido com 10% de soro de coelho, mantido em estufa a 30°C e utilizados próximo ao terceiro dia de incubação, livre de contaminação e de autoaglutinação (FAINE, 1999). Através da contagem em câmara de Neubauer encontrou-se aproximadamente 1×10^7 leptospiras por mL de meio de cultura (GANDA,2014).

3.4.2.3 Controles utilizados na Padronização

As amostras de soro sanguíneos (anticorpo primário) utilizados na padronização eram procedentes da biblioteca do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-FAMEV-UFG). Como controle positivo foi utilizado um *pool* de 20 amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para leptospirose todos, reagentes ao MAT para os sorovares, Canicola, Hardjo, Hebdomadis e Icterohaemorrhagiae com títulos entre 1: 100 a 1: 1600.

O controle negativo, constituído de um *pool* de 20 amostras de soro sanguíneo de bovinos sabidamente negativos para leptospirose, sem sintomatologia clínica e não reagentes ao MAT. Também foi feito um controle branco, para avaliar a qualidade dos reagentes utilizados no teste. Todas as reações foram realizadas em duplicita.

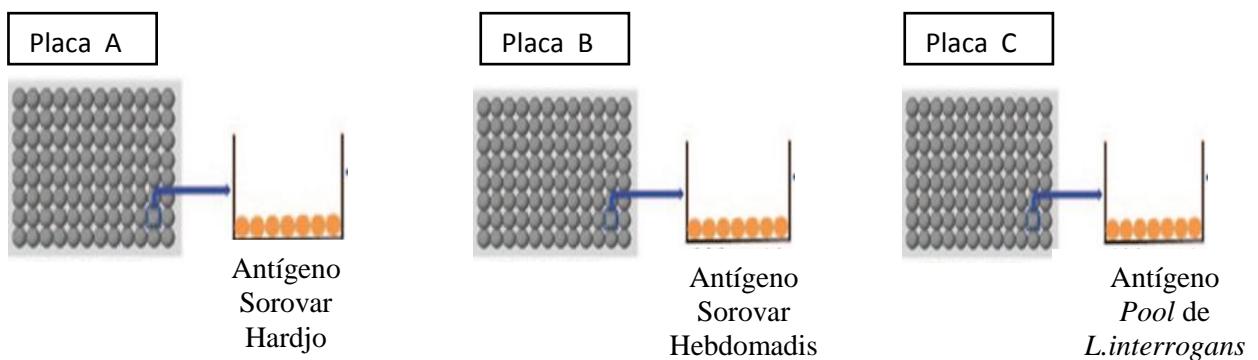
3.4.3 Padronização do ELISA indireto

O teste de ELISA indireto foi padronizado de acordo com Madruga et al.(2001) e Soares (2013), com algumas modificações e divididos em três etapas:

Primeira etapa- Sensibilização:

Foram sensibilizadas três placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços (MaxiSorp, Nunc), denominadas A, B e C, conforme Figura 1.

Figura 1. Esquema de Sensibilização do ELISA indireto.



Fonte: Adaptado de Gan (2013)

Todas as placas foram sensibilizadas com três diluições diferentes do antígeno sendo 1:50, 1:100 e 1:200, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO_3 0,1M, pH8,6), colocados nas placas utilizando-se por poço um volume de 50 μL , de acordo com as concentrações ou diluições mapeadas, conforme a Figura 2 e 3, e incubadas *overnight* a 4°C por 16 horas.

No dia seguinte, o conteúdo das placas foi descartado, e as mesmas foram bloqueadas adicionando 300 μL /poço de Tampão fosfato de sódio (PBS 0,01M pH 7,4) acrescido de leite desnatado a 5% (PBSM 5%), incubando-as por duas horas a 37°C.

Segunda etapa: Adição do Anticorpo Primário

Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS e adicionaram-se 50 μL do *pool* com os anticorpos primários positivos (10 μL de cada soro bovino a testar) positivos e o *pool* com anticorpos negativo (10 μL de cada soro) também em três diluições diferentes, 1: 50, 1:100 e 1:200 previamente diluídos em Tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% e leite desnatado a 5% (PBSTM), e depois as placas foram levadas a estufa à 37°C por uma hora.

Terceira etapa: Adição do anticorpo anti-IgG bovino conjugado à peroxidase

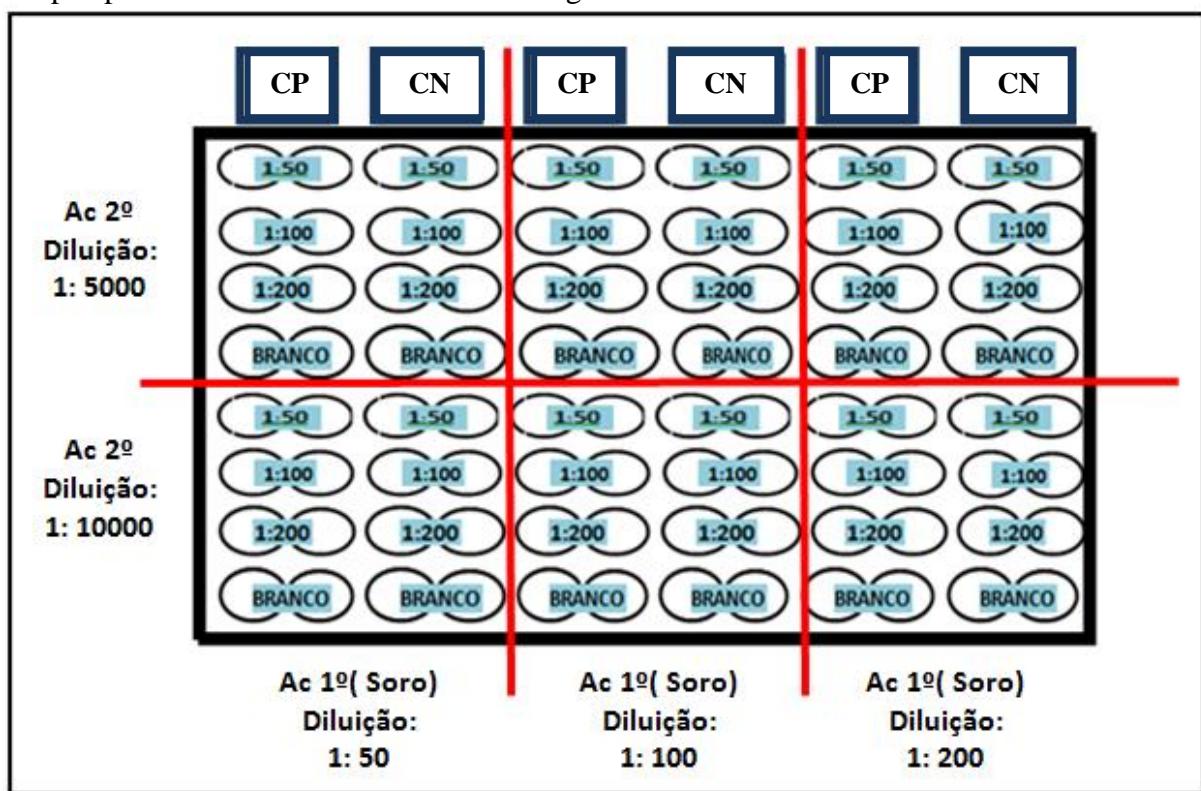
Após uma hora de incubação, as placas foram lavadas três vezes com Tampão fostato de sódio com Tween a 0,05% (PBST 0,05%) e, em seguida, adicionaram-se 50 μL /poço do conjugado com anticorpo anti-IgG bovino conjugado à peroxidase (Sigma), nas diluições de 1:5000 e 1:10000, diluído em PBSTM, e incubadas em estufa a 37°C por uma hora.

Após incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão PBST 0,05%. Para revelação da reação diluiu-se uma pastilha de ortofenilenodiamino (OPD, 15mg, Amresco) em 22,5 mL de água MilliQ e 9,75 µL de peróxido de hidrogênio.

Adicionaram-se 100 µL dessa solução em cada poço da placa, que foi mantida sem a exposição à luz durante 15 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N (25 µL), efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate - TP-Reader.

As concentrações e diluições ideais foram as que apresentaram a maior diferença em densidade óptica (DO) entre amostras de soro positivas e negativas.

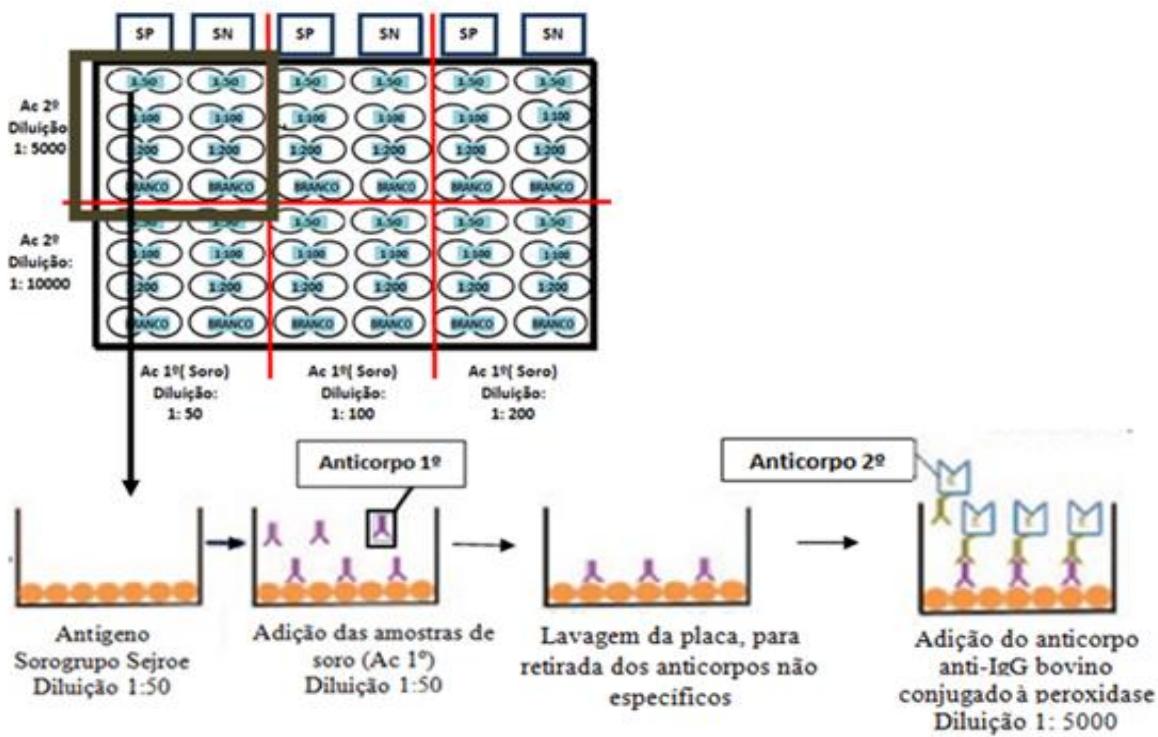
Figura 2. Mapeamento da Padronização dos ELISAs indiretos para diagnóstico de Leptospirose bovina realizado nos três antígenos testados.



Fonte: Adaptado de Soares (2013)

SP- Soros positivos; SN- Soros negativos; Ac 1º- Anticorpo Primário; Ac 2º- Anticorpo Secundário; - Antígeno diluído na concentração 1:50; - Antígeno diluído na concentração 1:100; - Antígeno diluído na concentração 1:200

Figura 3. Esquema da adição dos reagentes (antígeno, anticorpos primário e secundário), conforme mapeamento da Padronização do ELISA indireto para diagnóstico de Leptospirose em bovinos realizada nas três padronizações.



Fonte: Adaptado de Soares(2013) e Gan(2013)

Foram realizados os mesmos procedimentos com as outras titulações e concentrações dos reagentes conforme o mapeamento na Figura 1.

3.4.4 ELISA indireto

Os resultados das concentrações e diluições ótimas dos reagentes encontradas através da padronização estão demonstrados na Tabela 2.

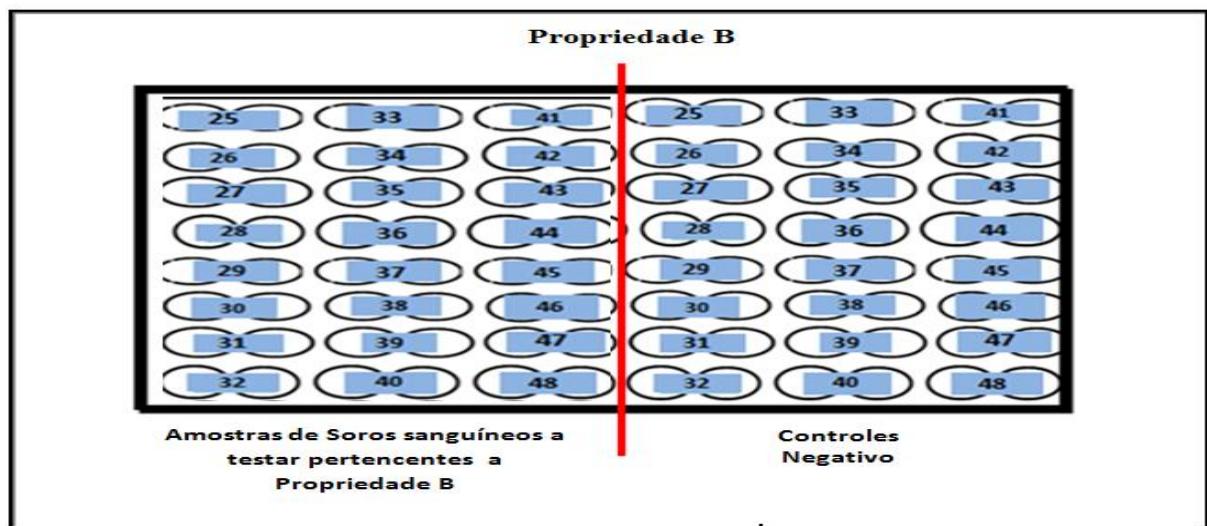
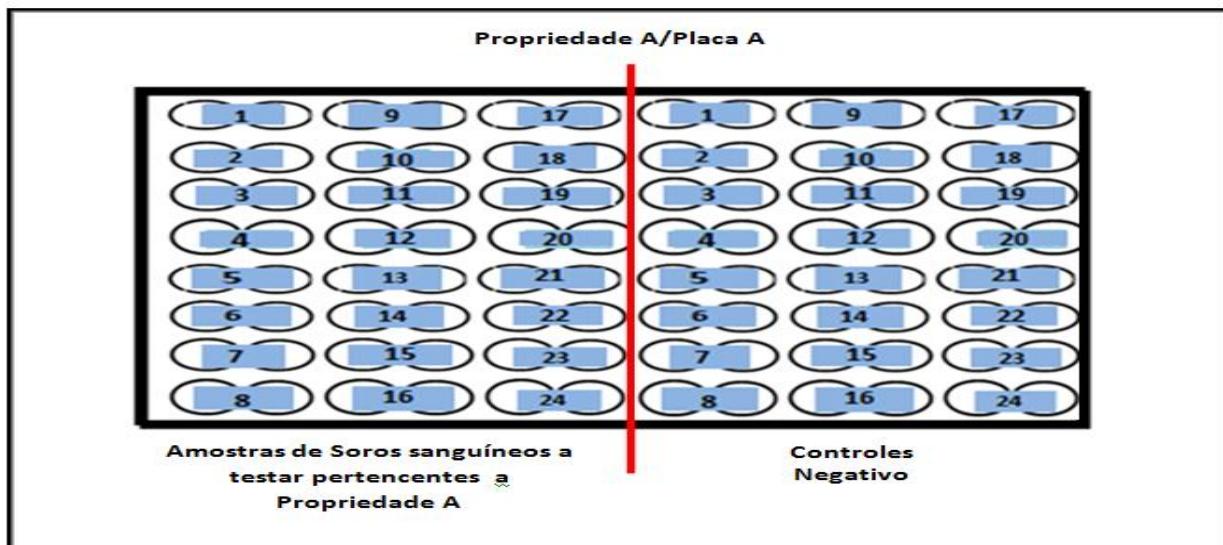
Tabela 2 Resultados das concentrações e diluições ótimas dos reagentes para os três ELISAs indiretos utilizado como diagnóstico de Leptospirose bovina.

Reagentes	ELISA/Hardjo	ELISA/Hebdomadis	ELISA/Pool
Antígeno	1:50	1:200	1:100
Anticorpo primário	1:50	1:50	1:50
Anticorpo secundário	1:5000	1:5000	1:5000

O protocolo realizado na validação é similar ao da padronização. Foram utilizados os 48 soros a testar (24 da propriedade A e 24 da propriedade B), com adição dos controles negativos, 48 soros individuais sabidamente negativos para leptospirose confirmados pelo MAT e fornecidos pelo LADOC-FAMEV-UFU. Sendo utilizados 24 controles negativos para cada propriedade, conforme Figura 4.

O ponto de corte (*cut-off*) foi calculado pela média da densidade óptica dos controles negativos previamente testados em duplicata somadas a três vezes o desvio padrão desses valores, obtendo-se um 99,8% de confiança (MADRUGA et al., 2001). Os *cut-off* dos ELISA/Hardjo, Hebdomadis e *Pool*, foram respectivamente, 0.209; 0.245 e 0.382.

Figura 4 Mapeamento dos resultados das concentrações e diluições ótimas dos reagentes para os três ELISAs indiretos utilizado como diagnóstico de Leptospirose bovina



3.5 Diagnóstico Molecular

As amostras de urina submetidas ao PCR foram realizadas no Instituto Biológico, São Paulo, SP. Foram selecionados seis animais de cada propriedade, sendo estes reagentes tanto no MAT como nos três ELISAs, de maneira que confirmássemos a eliminação da leptospira na urina. Todo o protocolo empregado desde o preparo das amostras, extração até a análise do produto amplificado foi realizado conforme protocolo interno do Instituto.

3.5.1Preparo das amostras para a PCR

Foram centrifugadas 1mL de urina a 13.000 rpm a 24°C por 30 minutos e o sedimento ressuspenso em 100µl de tampão TE (Tris- EDTA).

3.5.2Extração das amostras de urina

O protocolo de extração do DNA foi realizada com o reagente comercial DNAzol (Invitrogen®) adaptado de Chomczynski (1993), onde foram adicionados 100 µL da amostra a 1mL do reagente DNAzol (INVITROGEN).

As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 10.000 x g /10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao “pellet” adicionar 500 µl de etanol absoluto puro e deixado à temperatura ambiente por 1 a 3 minutos para precipitar o DNA do lisado; centrifugado a 4000 x g/ 2min e descartado o sobrenadante.

Foram realizadas duas lavagens do “pellet” de DNA com 850 µl de etanol absoluto, 75%, aguardando-se 1 minuto para sua precipitação. Centrifugado a 4000 x g/ 2min.

Retirado todo o etanol com a pipeta e aguardar aproximadamente 20 segundos para secar o DNA Dissolvido o DNA em 100 µl de NaOH (8 mM), passando o “pellet” através de uma pipeta. Adicionar 50 µl de solução Hepes 0,1 M para ajustar a solução de DNA para pH neutro.

3.5.3Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A metodologia para emprego da técnica de PCR foi realizada com os *primers* gênero específico *Leptospira* spp - fragmento de 331 bp (Lep 1: 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3' e Lep 2: 3' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 5') descrito por Mérien et al, 1992.

3.5.4 Amplificação do DNA

Para uma reação final de 50 μ L, foram adicionados 17,2 μ L de água, 5 μ L de tampão 10 X (500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0), 1,5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 8 μ L da mistura de dNTPs (200 μ M de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]), 5 μ L dos primers a 10 pM (Lep 1 e Lep 2), 0,4 μ L de Taq DNA polimerase e 10 μ L da amostra de DNA extraído.

3.5.5 Ciclo empregado (Termociclador)

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 (94°C /60s), hibridização (63°C /90s), extensão (72°C /120s), extensão final (72°C/ 10min).

Como controle positivo da PCR para a leptospirose foi utilizado o sorovar Canicola.

Como controle negativo da PCR foi utilizado a mistura da reação da PCR sem DNA, contendo 10 μ L de água ultrapura.

3.5.6 Análise do produto amplificado

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 o gel submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. O padrão de peso molecular empregado foi de 100 bp.

O gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320 nm).

3.5.7 Análises estatísticas

A sensibilidade relativa e especificidade do teste ELISA para a detecção de anticorpos anti leptospira em soros de bovinos em comparação com o MAT, foi realizado como descrito por Madruga et al. (2001).

Para determinar a concordância entre os testes realizados e o teste padrão, calculou-se também o índice *Kappa*, segundo interpretação de Rosner (2006), utilizando o programa Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007)

4 RESULTADOS

Dos 24 bovinos, provenientes da propriedade A, submetidos ao MAT, 9 (37,50%) foram reagentes para um ou mais sorovares, destes, apenas 2 (8,33%) apresentaram titulações maiores que 1:100.

Os sorovares observados entre os animais sororreagentes eram Hardjo e Hebdomadis, sendo 4 bovinos reagentes aos dois. Em relação aos resultados dos três testes de ELISA sensibilizados com os抗ígenos Hardjo, Hebdomadis e Pool, 20(87,50%), 15(62,50%) e 5 (20,83%) bovinos foram reagentes, respectivamente. Os dois animais com títulos iguais a 1:200, também reagiram nos três ELISAs.

Um bovino foi reagente no MAT tanto para o sorovar Hardjo como para o Hebdomadis, contudo reagiu somente no ELISA/Hebdomadis e um animal foi negativo em ambos os testes.

Treze bovinos considerados negativos ao MAT reagiram positivamente em pelo menos um dos ELISAs, somente dois bovinos encontraram-se negativos em ambos os testes. Os resultados da propriedade A estão melhores discriminados na Tabela 3.

Tabela 3 Resultados do MAT, com títulos de anticorpos aglutinantes anti- *Leptospira* spp. e dos ELISAs sensibilizadas com os três抗ígenos, para a Propriedade A.

Identificação Animal	MAT	Sorovar	ELISA/ Hardjo	ELISA/ Hebdomadis	ELISA/ Placa Pool
1	1:200	Hardjo/Hebdomadis	+	+	+
2	1:200	Hardjo	+	+	+
3	-	—	+	+	+
4	-	—	+	+	-
5	-	—	+	+	-
6	-	—	+	+	-
7	-	—	+	+	-
8	1:100	Hardjo/Hebdomadis	-	-	-
9	-	—	+	+	-
10	1:100	Hardjo/Hebdomadis	+	+	-
11	-	—	+	+	-
12	1:100	Hardjo	+	+	-
13	1:100	Hardjo/Hebdomadis	-	+	-
14	-	—	+	-	-

15	-	—	+	-	-
16	-	—	-	-	-
17	-	—	+	-	+
18	-	—	+	-	+
19	-	—	+	-	-
20	1:100	Hardjo	+	-	-
21	1:100	Hardjo	+	+	-
22	1:100	Hardjo	+	+	-
23	-	—	+	+	-
24	-	—	+	-	-

A propriedade B apresentou 11(45,83%) dos 24 bovinos reagentes ao MAT, para os sorovares Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi e Canicola, sendo os dois primeiros os mais prevalentes.

Dois bovinos apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:400, os quais também foram positivos nos ELISAs sensibilizados com o antígeno Hardjo e Hebdomadis.

Os três ELISAs apresentaram, 21(87,50%), 14(58,33%) e 2(8,33%) bovinos reagentes, respectivamente.

Dois animais foram negativos em ambos os testes. Os sorovares Icterohaemorrhagiae, Tarassovi e Canicolam reagiram nos ELISAs, Hardjo e Hebdomadis, sendo que somente o sorovar Icterohaemorrhagiae, reagiu no ELISA/*Pool*.

Dez bovinos classificados como não reagentes ao MAT, reagiram positivamente em pelo menos um dos ELISAs, cinco bovinos foram reagentes em três ELISAs e negativos no MAT, conforme Tabela 4

Tabela 4 Resultados do MAT, com títulos de anticorpos aglutinantes anti- *Leptospira* spp. e dos ELISAs sensibilizadas com os três antígenos, para a Propriedade B.

Identificação Animal	MAT	Sorovar	ELISA/ Hardjo	ELISA/ Hebdomadis	ELISA/ Placa Pool
25	-	—	+	+	-
26	-	—	+	+	-
27	100	Hardjo/Hebdomadis	+	+	-
28	800	Hardjo/Hebdomadis	+	+	-
29	100	Hardjo/Hebdomadis	+	-	-
30	100	Hardjo/Hebdomadis	+	-	-
31	100	Hardjo/Hebdomadis	+	-	-
32	100	Hardjo/Hebdomadis	-	-	-
33	100	Hardjo	+	+	+
34	100	Icterohaemorrhagiae	+	+	+
35	100	Hardjo/Hebdomadis	+	+	-
36	100	Tarassovi/Canicola	+	+	-
37	400	Hardjo/Hebdomadis	+	+	-
38	-	—	+	+	-
39	-	—	+	+	-
40	-	—	-	-	-
41	-	—	+	+	-
42	-	—	+	+	-
43	-	—	+	+	-
44	-	—	+	-	-
45	-	—	+	-	-
46	-	—	+	-	-
47	-	—	+	-	-
48	-	—	-	-	-

Os sorovares mais prevalentes neste trabalho considerando as duas propriedades foram Hardjo (79,16%) e Hebdomadis (54,16%), sendo que 13 (27,08%) destes foram positivos para os dois sorovares.

O teste de ELISA/Sorovar Hardjo detectou 44,79% (43/96) de bovinos soropositivos, enquanto apenas 20,83% (20/96) foram reagentes no MAT, houve concordância entre o ELISA e o teste padrão, sendo o índice *Kappa* considerado bom. Os resultados dos cálculos da sensibilidade e especificidade, bem como a sua concordância comparada ao teste padrão, realizado nas propriedades A e B, estão na Tabela 5.

Tabela 5 Comparação dos resultados dos soros bovinos das duas propriedades entre as técnicas MAT e ELISA/ Sorovar Hardjo para detecção de anticorpos anti-leptospira, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.

ELISA indireto (Sorovar Hardjo)	MAT		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	18	25	43
NEGATIVO	2	51	53
TOTAL	20	76	96

Sensibilidade= 90%; Especificidade= 67,10%; Concordância= 72,92%; *Kappa*= 0,4157

O teste de ELISA/Sorovar Hebdomadis detectou 30,20% (29/96) de bovinos soropositivos, enquanto apenas 20,83%(20/96) foram reagentes no MAT, houve concordância entre o ELISA e o teste padrão, sendo o índice *Kappa* considerado bom. Os resultados dos cálculos da sensibilidade e especificidade, bem como a sua concordância comparada ao teste padrão, realizado nas propriedades A e B, estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 Comparação dos resultados dos soros bovinos das duas propriedades entre as técnicas MAT e ELISA/ Sorovar Hebdomadis para detecção de anticorpos anti-leptospira, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.

ELISA indireto (Sorovar Hebdomadis)	MAT		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	14	15	29
NEGATIVO	6	61	67
TOTAL	20	76	96

Sensibilidade= 70%; Especificidade= 80,26%; Concordância= 78,13%; *Kappa*= 0,4312

O teste de ELISA/*Pool* detectou 7,29% (7/96) de bovinos soropositivos, enquanto apenas 20,83% (20/96) foram reagentes no MAT, não houve concordância entre o ELISA e o teste padrão, sendo o índice *Kappa* considerado fraco. Os resultados dos cálculos da sensibilidade e especificidade, bem como a sua concordância comparada ao teste padrão, realizado nas propriedades A e B, estão na Tabela 7.

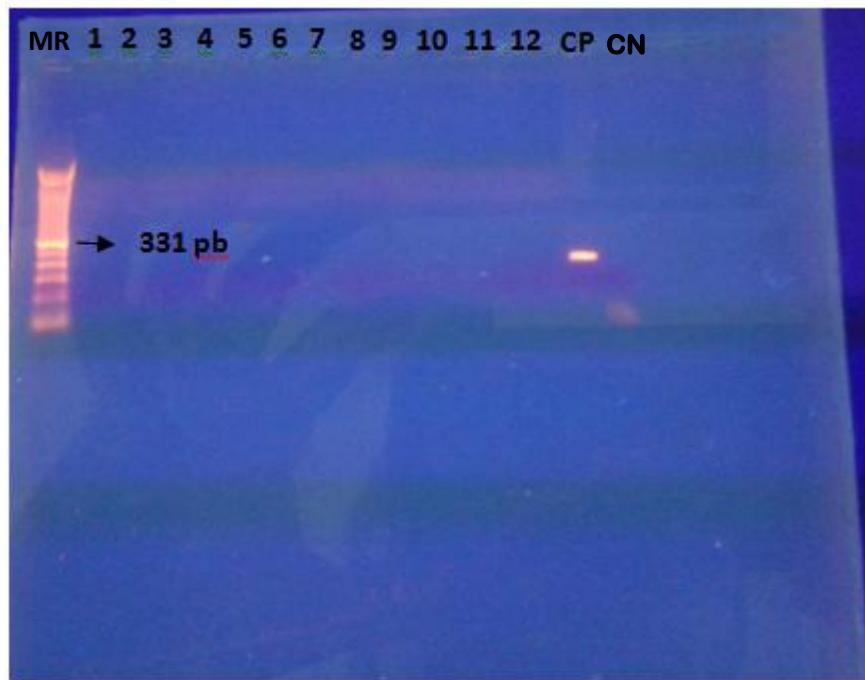
Tabela 7 Comparação dos resultados dos soros bovinos das duas propriedades entre as técnicas MAT e ELISA/ *Pool* de Sorovares para detecção de anticorpos anti-leptospira, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.

ELISA indireto (<i>Pool</i> de Sorovares)	MAT		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	4	3	7
NEGATIVO	16	73	89
TOTAL	20	76	96

Sensibilidade= 20%; Especificidade= 89,47%; Concordância= 80,21 %; *Kappa*= 0,2111

Para a realização da PCR, foram selecionadas 12 amostras de urina, seis de cada propriedade, provenientes de bovinos reagentes aos dois testes. Todos os animais foram considerados negativos no PCR conforme Figura 5.

Figura 5 Resultado do PCR na detecção do DNA de *Leptospira* spp na urina de bovinos com titulações maiores ou iguais a 100 no MAT e positivos nos três ELISA.



Fonte: Instituto Bológico. Coluna MR: Marcador de tamanho de fragmento de (100pb); Coluna 2: amostra 1; Coluna 3: amostra 2; Coluna 4: amostra 3; Coluna 5: amostra 4; Coluna 6: amostra 5; Coluna 7: amostra 6; Coluna 8: amostra 7; Coluna 9: amostra 8; Coluna 10: amostra 9; Coluna 11: amostra 10; Coluna 12: amostra 11; Coluna 13: amostra 12; Coluna 14: Controle Positivo

5 DISCUSSÃO

As duas propriedades pesquisadas apresentaram poucos animais reativos no MAT, entretanto quando realizado os testes de ELISAs nas amostras de soro dos bovinos, obtivemos um número expressivo de animais reagentes.

Na propriedade A, nove bovinos foram reagentes no MAT, sendo sete com títulos iguais a 100 e dois com títulos de 200, considerando que, esta não apresentava casos da doença há pelo menos três anos, possuía um calendário de vacinação contra leptospirose e não tinha um histórico de problemas reprodutivos, julgando somente pelo histórico clínico e leitura do MAT, neste caso os títulos de ordem 100 podem estar relacionados com reações vacinais.

Títulos baixos no MAT também podem ser decorrentes, de um prévio contato do animal com a bactéria, o que pode ocorrer em áreas endêmicas onde a leptospirose é

frequente, caso de Uberlândia-MG onde se encontra a propriedade A (CHAMPAGNE, 1991; FAINE et al.; 2000; CASTRO, 2011).

Todavia, os três ELISAs utilizados com os antígenos Hardjo, Hebdomadis e *pool*, identificaram 87,50%, 62,50%, 20,83% de bovinos reagentes, sendo que todos os bovinos sororreagentes ao MAT, exceto um, foram detectados em pelo menos um dos três ELISAs. A possibilidade de reação vacinal não pode ser descartada, já que ambos os testes utilizam como antígeno culturas de *L.interrogans*.

Quando o sorovar é adaptado ao hospedeiro, caso do sorovar Hardjo a infecção é crônica, nesse caso a imunoglobulina G é a mais produzida, eventualmente isto tenha influenciado na sensibilidade do teste, pois foi utilizado um conjugado anti -IgG bovina como anticorpo secundário.

Na propriedade B, 11 animais apresentaram títulos baixos (1:100) no MAT, como dito anteriormente, podem corresponder a uma infecção antiga porém, como a propriedade apresentava um caso recente de surto, essa hipótese pode ser descartada, a possibilidade dos títulos serem reações vacinais, também existe já que a propriedade também seguia um calendário de vacinação.

Os sorovares Icterohaemorrhagiae, Tarassovi e Canicola estão presentes na composição de vacinas comerciais que foram utilizadas nas propriedades, o que explica o aparecimento dos mesmos no MAT em baixos títulos.

Nos três ELISAs realizados, Hardjo, Hebdomadis e *Pool*, 22(87,50%), 14(58,33%) e 2(8,33%) bovinos foram reagentes, respectivamente.

Dois dos 24 animais analisados na propriedade B, os quais apresentaram títulos de 1:400 e 1:800 no MAT, também foram positivos nos ELISAs sensibilizados com o antígeno Hardjo e Hebdomadis.

Segundo Vasconcelos (1997) títulos acima da ordem de 400 indicam um início de infecção, levantando a suspeita de que talvez existam mais animais positivos na propriedade, porém os níveis de anticorpos estariam abaixo do limiar de detecção do MAT, já que este teste detecta as imunoglobulinas na segunda semana da doença, sendo os títulos máximos alcançados na terceira semana de infecção (TURNER, 1968; PICARDEAU, 2013).

Faine (1999) afirmou que este tipo de imunoglobulina IgG aparece com uma a duas semanas de infecção, persistindo durante semanas e meses, o que indica que a mesma pode ter sido detectada pelo teste.

Os sorovares Hardjo e Hebdomadis foram os mais prevalentes neste trabalho considerando as duas propriedades, o primeiro já era esperado pois a sorovariedade Hardjo

pertencente a seu sorovar é a mais frequente em todo o mundo, portanto, a maior causadora de problemas reprodutivos em bovinos (ELLIS, 1994).

Em relação ao sorovar *Hebdomadis* que teve alta prevalência nesta pesquisa, geralmente está associado a infecções accidentais, cuja transmissão indireta está associada ao contato com outras espécies silvestres (camundongos, tatu, galinha) que podem atuar como reservatórios de *Leptospiras* spp. nos rebanhos (OLIVEIRA et al., 2010).

Sua presença, em bovinos tem sido relatada em rebanhos mundialmente (ADLER, 2015). Silva et al. (2015), em um estudo retrospectivo da ocorrência de animais com anticorpos antileptospira na microrregião de Uberlândia – MG, encontrou nos anos de 2010, 2011, 2012, 2013, 2014 e 2015 uma frequência de animais sororreagentes para *Leptospira interrogans* sorovar *Hebdomadis* de respectivamente: 15% (10/63), 21% (7/33), 19,5% (20/103), 38% (103/270), 8,75% (9/105) e 90% (82/91).

Lopes et al. (2010) analisando 284 vacas no sul da Bahia, encontraram 107 animais positivos para o sorovar *Hebdomadis*, sendo que algumas destas foram positivas para até três sorovariedades.

Mineiro et al. (2007) analisando 1.975 amostras, pertencentes a 16 rebanhos diferentes em Parnaíba- Piauí, identificaram o sorovar *Hebdomadis* como o terceiro mais prevalente com 12,2%.

Apenas um bovino, dos 14 que reagiram no MAT para os dois sorovares concomitantemente, apresentou reatividade exclusivamente, no ELISA sensibilizado com o antígeno *Hebdomadis*. Visto que este sorovar, não está presente nas vacinas disponíveis no mercado, bovinos com títulos de 1:100 já são considerados reagentes ao teste.

Dos 20 (41,66%) bovinos reagentes no MAT com títulos maiores ou iguais a 100, 13 (65%) foram reagentes aos sorovares *Hardjo* e *Hebdomadis* o que pode indicar uma reação cruzada entre eles ou até mesmo a presença dos dois na propriedade. Estas reações cruzadas entre sorovares de sorovares diferentes é comum e podem ocorrer devido a similaridade antigênica e ou molecular entre as mesmas (LEVETT, 2001; AHMAD et. al, 2005).

As amostras que reagiram para os sorovares *Icterohaemorrhagiae*, *Tarassovi* e *Canicola* no MAT, reagiram nos ELISAs com os抗ígenos *Hardjo* e *Hebdomadis*, sendo que somente a amostra reagente ao sorovar *Icterohaemorrhagiae*, reagiu no ELISA/pool, demonstrando que estes抗ígenos não são sorovar-específicos, reforçando a ideia de reatividade cruzada.

Apesar dos ELISAs desenvolvidos neste trabalho terem utilizado os mesmos抗ígenos empregados no MAT, com exceção do ELISA/*Pool*, todos obtiveram uma sensibilidade acima

de 70% e especificidade acima de 67%, além disso, alcançaram uma boa concordância com o teste padrão e uma boa reproduzibilidade onde os valores encontrados de *kappa* ficaram entre 0,40 e 0,75 (ROSNER, 2006).

Outros autores encontraram resultados maiores, utilizando proteína recombinantes, tais como a LipL32, a qual possui concentração elevada de antígenos imunorreativos que confere uma alta sensibilidade e especificidade

Tomich et al. (2007), analisando 282 amostras de soro bovino, tiveram como resultado, 143 (50,71%) animais reagentes ao SAM e 161 (57,09%) no ELISA, com uma sensibilidade comparada ao MAT de 99,30% e especificidade de 86,33 para o diagnóstico de leptospirose bovina.

Surujballi e Mallory (2004), empregando como antígeno uma suspensão de células contendo seis sorovares, constataram uma sensibilidade e especificidade do ensaio de 93,5% e 94,7% respectivamente em humanos.

Flannery (2001) comparando diferentes proteínas recombinantes, em 50 soros de pacientes de hospitais em Salvador-Bahia, concluiu que A LipL 32 foi a que demonstrou melhor especificidade 95%, e especificidades variando 90-97%, contra 72%, 44%, e 32% das proteínas OmpL1, LipL41 e Hsp58 respectivamente.

Os ELISAs baseados nas proteínas recombinantes alcançaram sensibilidades de 16%, 24%, e 18% durante a fase aguda e 72%, 44%, e 32% durante a fase crônica, respectivamente.

Priya et al. (2003), ao utilizarem como antígeno a LPS de *L. biflexa* sorovar Patoc, obtiveram sensibilidade de apenas 48% em humanos.

O antígeno *L. interrogans* sorovar Hardjo, foi o que possuiu uma melhor sensibilidade, no ELISA a qual foi de 90%. O ELISA utilizando como antígeno Hebdomadis, em regiões onde sua frequência é elevada poderia ser uma ferramenta útil, principalmente para identificar os falsos positivos, já que o teste obteve uma especificidade de 80,26% e uma sensibilidade mais baixa de 70%.

Já o ELISA utilizando um *pool* de *L. interrogans*, obteve uma baixa sensibilidade e especificidade comparada a outros autores, 20% e 89,47% respectivamente, apresentando um baixo índice *Kappa*, revelando que a concordância entre os testes foi fraca.

O PCR tem sido nos últimos anos cada vez mais utilizado para o diagnóstico da leptospirose, devido à sua sensibilidade e capacidade para dar um diagnóstico precoce, pois é capaz de detectar o agente na fase de leptospiremia (LOUREIRO, 2013).

A eliminação da leptospira na urina ocorre de forma intermitente e não apresenta relação com os níveis de anticorpos, ou seja, não existe uma maior ou menor frequência da eliminação da bactéria em relação a sororreatividade (ADLER e DE LA PENÃ MOCTEZUMA, 2010).

Portanto a PCR não confirma o MAT e deve ser utilizada como um diagnóstico individual em uma tentativa de encontrar os animais que atuam como hospedeiro da doença.

Nenhuma amostra submetida ao PCR reagiu positivamente, o que pode ser explicado pela eliminação intermitente da bactéria na urina (GÍRIO, 2005; FAINE, 1999).

A presença de substâncias inibidoras da própria urina, tais como uréia, creatinina, dificultam a extração do DNA, o que também pode ter interferido no teste (BOOM et al., 2004; BAREA, 2001).

Segundo Lucchesi (2004) o congelamento da amostra, antes de proceder a extração do DNA, provoca a lise das leptospiras durante a estocagem e como resultado, seu DNA pode ser perdido com o sobrenadante após a centrifugação, o que não foi realizado neste trabalho as amostras foram estocadas a -86º e só depois foram realizadas as extrações.

Contudo alguns autores como Gumussoy et al. (2009) que realizaram um estudo, para determinar a soroprevalência da leptospirose em bovinos com auxílio da PCR, encontraram em 500 amostras de urina 7 (1,40%) positivas na PCR, as quais os soros sanguíneos também eram soropositivos no MAT.

Çetinkaya et al., investigando a prevalência de leptospirose em urina de bovinos abatidos em três grandes matadouros, no leste da Turquia, também utilizou como teste de diagnóstico o PCR, detectando em 473 amostras de urina 4,02% (19/473) reagentes.

Autores como, Bal et al.(2004) e Mérien et al. (2005) concluíram que a detecção de Leptospira na urina com o PCR é uma abordagem promissora para o diagnóstico precoce de leptospirose.

6 CONCLUSÃO

Os três ELISAs utilizando como antígenos culturas de *L.interrogans*, com exceção do *pool* de leptospiras, obtiveram uma média de 70% de sensibilidade e 67%, de especificidade alcançando uma boa concordância com o teste padrão e uma boa reproduzibilidade.

A propriedade A e B apesar de apresentarem baixos títulos de anticorpos aglutinantes no MAT, reagiram expressivamente nos ELISAs, correlacionando os dados encontrados nos testes, associados ao histórico da doença nas propriedades, acredita-se que os bovinos pertencente a propriedade A, estão com a doença na fase crônica e os da propriedade B em estágio inicial, ainda subclínico. É sempre importante correlacionar dois ou mais testes de diagnósticos, somado ao diagnóstico clínico, para aumentar a eficácia dos resultados.

REFERÊNCIAS

ADLER, B. Current Topics in Microbiology and Immunology:Leptospira and Leptospirosis, Springer Berlin Heidelberg : Germany, v.387, 295p. 2015

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3/4, p.287-296, 2010.

AHMAD,S.N.; SHAH,S.; AHMAD,F.M.H. Laboratory diagnosis of Leptospirosis analysis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.51, p. 195-200,2005.

ALT, D.P.;Z UERNER, R. L.; BOLIN, C.A. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, n.5, p.636-639, 2001.

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

ARENT, Z.; FRIZZEL, C.; GILMORE, C.; MACKIE, D.; ELLIS, W.A. Isolation of leptospires from genital tract of sheep. **Veterinary Record**, v.173, n.23, p.173-582, 2013.

AYRES, M.; et al. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. ONG Mamiraua. Belém, PA, 2007.

BAL, A.E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERT, R.A.; DE MEZA BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W.J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.8, p. 1894–1898, 1994.

BANCO DO BRASIL. Bovinocultura de leite: desenvolvimento regional sustentável, Serie caderno de propostas para a atuação em cadeias produtivas. Brasília, v.1, 2010.

BAREA J. A. Extração De DNA De Material De Arquivo E Fontes Escassas Para Utilização Em Reação De Polimerização Em Cadeia (PCR), Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica) Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, Botucatu-São Paulo, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Manual de Leptospirose.** 2^a. ed., Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT: legislação. Brasília, DF:188p., 2006.

BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine *leptospirosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1/2, p. 89-94, 2005.

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**, v.62, n.7, p. 995-1000, 2001.

BROWN, C. A.A. WAYNE, R; MILLER, M.A.; DAVIS, D. A.; BROWN, S. A.; BOLIN, C. A.; JARECKI-BLACK ,J.; GREENE, C. E.; MILLER-LIEB, D. *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa infection in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 7, p.1265-1267,1996.

CASTRO,J.R.; SALABERRY, S. R.; SOUZA,M.A.; LIMA,A. M.C. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.2, p ,217-222, 2011.

ÇETİNKAYA, B.; ERTAŞ, H. B.; ÖNGÖR, H.; MUZ, A. Detection of Leptospira Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Urine of Cattle, **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, n.24, p. 123-130, 2000.

CHALAYON, P.; CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P.;KALAMBAHETI, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n.5., p.289-97, 2011.

CHAMPAGNE, M.J .; HIGGINS, R.; FAIRBROTHER, J .M .; DUBREUIL, D.Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.55, n.3, p. 239–245, 1991

CHIARELI, D.; MOREIRA E.C.; GUTIÉRREZ, H.O.D.; RODRIGUES, R.O.; MARCELINO, A.P.; MENESSES, J.N.C.; ALMEIDA, V.M.A. Frequênciade aglutininas anti- *Leptospira interrogans* em equídeos em Minas Gerais, 2003 a 2004. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6,p.1567-1579, 2008.

CORTESE,V.; BEHAN,S. ; GALVIN,J.; PENKA,D.; RAMSEY, D.; BRYSON,W.; LUCAS,M. Evaluation of two antimicrobial therapies in the treatment of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo infection in experimentally infected cattle. **Veterinary Therapy**, v.8, n.3, p. 201-208, 2007.

DE NARDI, G. **Perfil sorológico de anticorpos anti-Leptospira spp. em búfalas (*Bubalusbubalis*) vacinadas com tipos de vacinas comerciais anti-leptospirose (Bacterina e Membrana externa)**. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

DIRECTOR, A.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LOUREIRO, A. P.; MARTINS, G.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno

from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. **Journal of Medical Microbiology**, v.63, p.1234-1236, 2014.

ELLIS, W.A.; O'BRIEN, J.J.; CASSELLS, J.A.; NEILL, S.D.; HANNA, J. Excretion of *L. interrogans* serovar Hardjo following calving or abortion. **Research Veterinary Science**, v.39, n.3, p. 296-98, 1985.

ELLIS, W.A. **Leptospirosis as a cause of reproductive failure.** In: MILLER, R.B. The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Philadelphia, v.10, p.463-476, 1994.

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

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIM, C. PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**, 2. ed. Australia: Medical Science. 2000. 272p.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F.P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E.D.; FERREIRA, A.G.; RILEY, L.W.; REIS, M.G.; HAAKE, D.A.; KO, A.I. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 9, p. 3303-3310, 2001.

GANDA, M.R. **Utilização da PCR para detecção de DNA de *Leptospira* spp em sêmen e testículo bovino.** 2014. 50f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2014.

GAMAGE, C. D.; KOIZUMI, N.; MUTO, M.; NWAFOR-OKOLI, C.; KURUKURUSURIYA, S.; RAJAPAKSE, J. R.; KULARATNE, S. A.; KANDA, K.; LEE, R. B.; OBAYASHI, Y.; WATANABE, H.; TAMASHIRO, H. Prevalence and carrier status of leptospirosis in smallholder dairy cattle and peridomestic rodents in Kandy, Sri Lanka. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.11, n. 8, p. 1041- 1047, 2011.

GIANGASPERO, M.; BONFINI, B.; ORUSA, R.; SAVINI, G.; OSAWA, T.; HARASAWA, R. Epidemiological survey for *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci* var. *ovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp., Leptospirosis, and Orf virus among sheep from northern districts of Japan. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 5, p. 679-684, 2013.

GUIDI, R, C. **Leptospirose em pequenos animais.** 2006. Monografia (Especialista em Clinica Medica em Pequenos Animais)-Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, 54f. 2006.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W.; MEDEIROS, M. A. PCR detection of leptospiral carries among seronegative horses. **The Veterinary Record**, v.71, p. 105- 106, 2012.

HARTLEBEN, C. P.; LEAL, F. M. A.; MONTE, L. G.; HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; VASCONCELLOS, S. A.; BRIHUEGA, B.; DELLAGOSTIN, O. A. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for the diagnosis of swine leptospirosis. **Current Microbiology**, v.66,n.2, p.106-109, 2013.

HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA,M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical microbiology and infection**, v.17, n.4, p.494-501, 2011.

HODGES, R.T.; THOMPSON, J.; TOWNSEN, K.G. Leptospirosis in pigs: the effectiveness of streptomycin in stopping leptospiruria. *New Zealand Veterinary Journal*, v.27, n.6, p.124-126, 1979.

KOURY, M.C; SILVA, V. **Epidemiologia e Controle da Leptospirose Humana nas Regionais do município de Belo Horizonte, Minas Gerais**. Centro Universitário Metodista Isabela Hendrix. Belo Horizonte, 2006.

LANGONI, H.; SOUZA, L.C.; SILVA, A.V.; LUVIZOTTO,M.C.; PAES. A.C, LUCHEIS S.B.Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.40, n.3-4, p.271-275, 1999.

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

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

LOPES, L.B.; JÚNIOR, A.C.O.; MELO, C.B.; MCMANUS C.; LEITE, R.C. EFFECT OF *Leptospira* sp. Infection on reproductive efficiency of a crossbreed cattle herd in the south of Bahia state, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32,n.1, p.:51-54, 2010.

LOUREIRO, A. P.**Leptospirose e seu impacto na fase inicial da gestação de égua receptoras de embrião**. 2013. 83f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2013.

LUCCHESI, P.M.A.; ARROYO, G. H.; ETCHEVERRÍA, A.I.; PARMA,A. E.; SEIJO, A.C. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v,37,n.2,p.131-134, 2004

LUPI, OTILIA.; NETTO, M. A. C.; AVELAR, K .; ROMERO, C.; BRUNIERA, R.; BRASIL, P. Cluster of leptospirosis cases among military personnel in rio de janeiro, Brazil. *InternationalJournalofInfectiousDiseases*, v.17, n.2, p.129-131, 2013.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C.O.**Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Editora Embrapa Gado de Corte, 360p., 2001.

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, R. C.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent

infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 4, p. 773-777, 2012.

MELO, M. R.; MARTINS, A.R.; BARBOSA,I. V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** , v. 46 ,n. 5, p. 375-381,2010.

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P.; MERI, S.; CINCO, M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microbial Pathogenesis**, v.39, p.139-147, 2005.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, n.30, v.9, p.2219-2224.

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

MURRAY ,G. L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. **Veterinary Microbiology**, v.162, p.305–314, 2013.

OLIVEIRA, F. C.S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C.S.A.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; GONÇALES.; VASCONCELLOS, S.A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.5, p.398-402, 2008.

OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). **Leptospirosis**, Capítulo 2.2.4. 2006. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/> A_00043.htm. Acesso em 02.nov.2015

OTAKA, D. Y.; MARTINS, G.; HAMOND, C.; PENNA, B.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Serologyand PCR for bovineleptospirosis: herdandindividual approaches. **Veterinary Record**, v.170, p. 338, 2012.

PALANIAPPAN, R.U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y.F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 284-192, 2007.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecineet maladies infectieuses**, Paris, v.43, n.1, p.1-9, 2013.

PRIYA, C. G.; BHAVANI, K.; RATHINAM, S. R.; MUTHUKKARUPPAN, V. R. Identification and evaluation of LPS antigen for serodiagnosis of uveitis associated with leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 52, n. 8, p. 667-673, 2003.

QUINN, P. J. MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Espiquetas. In: Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Ed.Artmed, p.179-189, 2005

RIET-CORREA, F. ; SCHILD, A.L. ; MÉNDEZ, M.C. ; LEMOS,R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos.** São Paulo, v.2, 574 p.,2001

ROSNER,B. **Fundamentals of Biostatistics.** Boston: Duxbury Press, 2006. 876p.

SANTOS, G.O.; CARDOSO, F.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; CORTEZ, A.; FÁVERO, A.C.M.; MIRAGLIA, F.; PINHEIRO, S.R.; A MOS, C.A.A. Emprego do Ceftiofur sódico ou da Estreptomicina para a terapia de leptospirose em hamsters experimentalmente infectados com o sorovarpomona. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, n.1, p.1-8, 2001.

SILVA, R.C.; COSTA, V.M.; SHIMABUKURO, F.H.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; MENOZZI, B.D.; LANGONI, H. Frequency of Leptospira spp. in sheep from Brazilian slaughterhouses and its association with epidemiological variables.

Pesquisa Veterinária Brasileira, v.32, n.3, p.194-198, 2012.

SMITH, CR.; CORNEY, B.G.; MCGOWAN, M.R., MCCLINTOCK, C.S; WARD, W.; KETTERER, P.J. Amoxycillin as an alternative to dihydrostreptomycin sulphate for treating cattle infected whit Leptospira borgpetersenii serovarHardjo. **The Australian Veterinary Journal**, v.75,n.11, p.818-821, 1997.

SOARES, P.M. **Produção e Utilização de Anticorpos IgY Para Diagnóstico de Brucelose.** 2013. 119f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2013.

SUEPAUL, S.M.; CARRINGTON, C.V.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A.A. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.367-375. 2011.

SURUJBALLI, O. P.; MALLORY, M. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine anti-bodies to multiple Leptospira serovars. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 68, n. 1, p. 1-6, 2004.

TOMICH, R. G. P.; BOMFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Leptospirosis serosurvey in bovines from brazilian pantanal using IgG EliSA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**,v. 38, n. 4, p. 674-680, 2007.

VASCONCELLOS, S.A.; BARBARINI JÚNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z.M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A.C.M.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.7-15, 1997.

YAN,K.T.; ELLIS, W.A.; MACKIE, D.P.; TAYLOR, M.J.; McDOWELL, S.W.;MONTGOMERY, J.M. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo in cattle. 69, n.3, p. **Veterinary Microbiology**, v. 173-87, 1999.