

Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros¹

Anna M.C. Sarmiento², Sérgio S. Azevedo³, Zenaide M. Morais², Gisele O. Souza², Flávia C.S. Oliveira², Amane P. Gonçalves², Fabiana Miraglia² e Silvio A. Vasconcelos^{2*}

ABSTRACT- Sarmiento A.M.C., Azevedo S.S., Morais Z.M., Souza G.O., Oliveira F.C.S., Gonçalves A.P., Miraglia F. & Vasconcelos S.A. 2012. [Use of *Leptospira* spp. strains isolated in Brazil in the microscopic agglutination test applied to diagnosis of leptospirosis in cattle herds in eight brazilian states.] Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(7):601-606. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil. E-mail: savasco@usp.br

The aim of this study was to investigate the adequacy of the use of autochthonous strains of leptospires isolated in Brazil, added to antigen collection of the microscopic agglutination test (MAT) applied to the diagnosis of bovine leptospirosis. By means of non-probability sampling, 109 farms and 9,820 cattle, females at reproductive age were chosen from 85 municipalities in the states of Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina and São Paulo. Among the 9,820 examined animals, 5,806 (59.12%) were reactants at MAT for at least one serovar using the 23 reference serovars. Employing the collection of reference serovars and the ten autochthonous strains, 6,400 (65.24%) reactants and significant difference ($p=0.001$) was found. The most probable serovars identified by the collection of reference antigens were Hardjo (43.03%), Shermani (20%), Wolffi (9.96%), Grippothyphosa (5.42%) and Pomona (4.28%). With the collection amplified with the ten strains isolated in Brazil, the most probable serovars were Hardjo (31%), Guaricura-M4/84 (22.50%), Shermani (15.43%), Wolffi (4.76%), Grippothyphosa (3.71%) and Autumnalis (3.24%). The serovar Guaricura, strain M4/84, isolated from bovines and buffaloes in the State of São Paulo, was ranked as one of the three most probable serovars in the states of Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais and São Paulo. The addition of autochthonous strains to the MAT antigen collection provided the confirmation of the diagnosis of leptospirosis in 594 cattle (6%) which have been classified as non-reactants by the reference collection ($p=0.001$).

INDEX TERMS: *Leptospira* spp., leptospirosis, female cattle, diagnosis, microscopic agglutination test, autochthonous strains.

¹ Recebido em 31 de outubro de 2011.

Aceito para publicação em 25 de janeiro de 2012.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. Autor para correspondência: savasco@usp.br

³ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB 58700-970, Brasil.

RESUMO- O objetivo do presente trabalho foi investigar a conveniência do emprego de estirpes de leptospirose autóctones isoladas no Brasil, na coleção de antígenos da microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM) aplicada a leptospirose. Foram amostradas por conveniência 109 propriedades e 9820 bovinos, fêmeas em idade reprodutiva, distribuídos em 85 municípios, dos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio

Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Dos 9820 animais examinados, 5806 (59,12%) foram reagentes na SAM para pelo menos um sorovar com a coleção de 23 sorovares de referência. Com a coleção de antígenos de referência e dez estirpes autóctones houve 6400 (65,17%) reagentes, com diferença significativa entre as proporções ($p=0,001$). Os sorovares mais prováveis identificados com a coleção de antígenos de referência foram Hardjo (43,03%), Shermani (20%), Wolffi (9,96%), Grippothyphosa (5,42%) e Pomona (4,28%). Com a coleção ampliada por dez estirpes isoladas no Brasil, os sorovares mais prováveis foram Hardjo (31,00%), Guaricura-M4/84 (22,50%), Shermani (15,43%), Wolffi (4,76%), Grippothyphosa (3,71%) e Autumnalis (3,24%). O sorovar Guaricura, estirpe M4/84, isolada de bovinos e búfalos no Estado de São Paulo, despontou como um dos três sorovares mais freqüentes nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. A introdução de estirpes autóctones na coleção de antígenos da SAM propiciou a confirmação do diagnóstico de leptospirose em 594 animais (6,00%) classificados como não reagentes pela coleção de referência ($p=0,001$).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Leptospira* spp., leptospires, vacas, diagnóstico, soroaglutinação microscópica, estirpes autóctones.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose bacteriana causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (Côrtes 1993), com distribuição geográfica cosmopolita, no entanto, sua ocorrência é maior em países de clima tropical e subtropical, principalmente nos períodos de altos níveis pluviométricos, devido à elevada sobrevivência da bactéria em ambientes úmidos, o que aumenta o risco de exposição e contaminação de animais suscetíveis e seres humanos.

Nos animais de produção, a leptospirose está associada a abortamentos, nascimento de produtos debilitados e natimortalidade. Nos bovinos, especificamente, as perdas econômicas causadas pela leptospirose estão direta ou indiretamente ligadas às falhas reprodutivas como infertilidade e abortamento, bem como à queda da produção de carne e leite, além de custos com despesas de assistência veterinária, vacinas e testes laboratoriais (Faine et al. 1999).

A despeito do Brasil ser o líder mundial em tonelagem de carne bovina exportada, os níveis de produção e produtividade dos rebanhos de corte e leite brasileiros ainda são muito baixos. Além da questão da presença de aftosa nos rebanhos, a carne brasileira, segundo alguns importadores, não é considerada de boa qualidade. Diversos fatores contribuem para esta condição: características genéticas, nutricionais, metabólicas e também aspectos sanitários, dentre os quais se destacam as doenças infecciosas e parasitárias que comprometem a reprodução. Dentre tais doenças a leptospirose ocupa uma posição de destaque, pois as condições climáticas e ambientais vigentes no Brasil são muito favoráveis à sua ocorrência.

No Brasil, as perdas econômicas produzidas pela leptospirose bovina estão relacionadas a falhas reprodutivas como: infertilidade, abortamento, natimortalidade, morte neonatal e nascimento de bezerros debilitados. Tais trans-

tornos levam a queda da produção de carne e leite, além dos custos com a assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais.

O diagnóstico da leptospirose pode ser efetuado pela demonstração do agente (métodos diretos) e por métodos indiretos (provas sorológicas) que são os mais indicados para o controle em populações de animais (Faine et al. 1999). Destes, o mais eficaz é a soroaglutinação microscópica (SAM). Diversos fatores afetam a especificidade e a sensibilidade desta prova, tais como: coleção de estirpes empregadas como antígenos, idade e densidade dos cultivos, diluição final dos soros, temperatura e tempo de incubação.

A recomendação oficial para a prova da SAM aplicada à leptospirose é que a coleção de antígenos empregada contenha pelo menos um representante por sorogrupo, contudo tem sido aventada a importância da inclusão de sorovares autóctones isolados no país ou região o que aumentaria a capacidade discriminadora do teste.

Tendo em vista a importância econômica da pecuária bovina no Brasil, a interferência negativa das doenças transmissíveis da reprodução, a presença da leptospirose como uma das principais patologias implicadas em tal processo e a necessidade do aprimoramento dos sistemas de diagnóstico laboratorial atualmente disponíveis, o objetivo do presente trabalho foi investigar a conveniência do emprego de estirpes de leptospirosas autóctones isoladas no Brasil, como antígenos incluídos na coleção de estirpes empregadas no teste de soroaglutinação microscópica aplicado à leptospirose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 9820 bovinos procedentes de 109 propriedades distribuídas em 85 de oito estados brasileiros: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Figura 1), nos quais a atividade pecuária é expressiva. As amostras de sangue foram colhidas no período de março de 2004 a maio de 2005. A determinação do número de animais examinados por propriedade considerou o número de

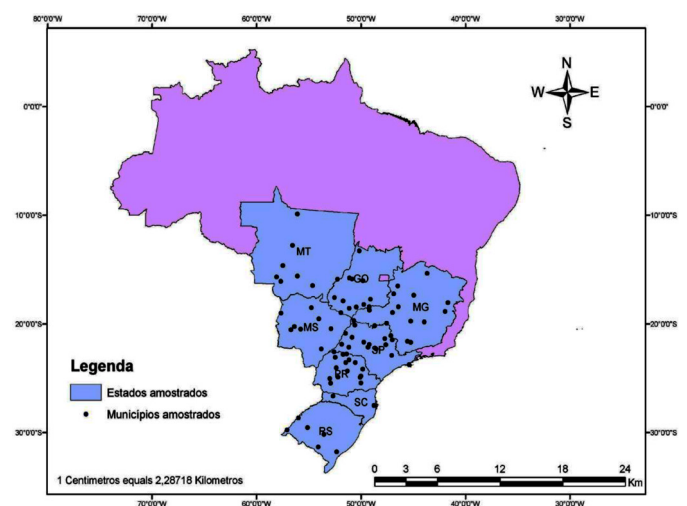


Fig.1. Mapa do Brasil representando os oito estados amostrados, as siglas nacionais correspondentes e a localização geográfica dos 85 municípios amostrados.

fêmeas em idade reprodutiva, com estimativa de prevalência de 4% e nível de confiança de 99% (Faine 1982).

O diagnóstico sorológico da leptospirose foi realizado com a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), de acordo com Galton et al. (1965) e Cole et al. (1973), utilizando uma coleção de antígenos vivos representada pelos sorovares de referência Castellonis, Javanica, Tarassovi, Whitcombi, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo (Hardjoprajitno), Hebdomadis, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Sentot, Wolffi, Pyrogenes, Butembo, Cynopteri, Panama, Shermani e Patoc, e dez estirpes autóctones isoladas de animais no Brasil, conforme descrito abaixo:

- **Estirpe AN 776:** isolada pelo Instituto Biológico de São Paulo, em 1961, por Santa Rosa et al. (1972) do rim de um marsupial (*Didelphis marsupialis*) capturado em áreas próximas a cidade de São Paulo, SP, Brasil, e foi tipificada como pertencente ao sorogrupo Bataviae e sorovar Brasiliensis (Ahmed et al. 2006).

- **Estirpe M7/87:** isolada pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), de rim de um suíno abatido em frigorífico do município de Carapicuíba, SP, e tipificada como pertencente ao sorogrupo Pomona, sorovar Pomona.

- **Estirpe M4/98:** isolada pelo LZB/VPS/FMVZ/USP de cultura dos rins de hamsters adultos jovens, inoculados com urina colhida de búfalas em maio de 1998, em uma fazenda localizada em Registro, Vale do Ribeira, São Paulo, SP, e tipificada como pertencente ao sorogrupo Sejroe, sorovar Guaricura (Vasconcellos et al. 2001, Ahmed et al. 2006).

- **Estirpe M9/99:** isolada pelo LZB/VPS/FMVZ/USP de tecido renal de *Rattus norvegicus* (ratazana) capturado em novembro de 1999, na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZ-SP), e tipificada como sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Copenhageni, semelhante à estirpe de referência M20 (Correa et al. 2004, Ahmed et al. 2006, Fagundes et al. 2008).

- **Estirpe LO1:** isolada pelo Laboratório de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do curso de Medicina Veterinária (CMV) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR, da urina de um cão, e tipificada como do sorogrupo Canicola, sorovar Canicola (Oliveira et al. 2005, Ahmed et al. 2006, Fagundes et al. 2008).

- **Estirpe LO4:** isolada pelo Laboratório de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da CMV/UEL, do fígado de um suíno abatido, e tipificada como pertencente ao sorogrupo Canicola, sorovar Canicola (Delbem et al. 2002, Freitas et al. 2004, Fagundes et al. 2008).

- **Estirpe LO14:** isolada pelo Laboratório de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da CMV/UEL, da urina de um bovino abatido, e tipificada como pertencente ao sorogrupo Canicola, sorovar Canicola (Ahmed et al. 2006, Zacarias et al. 2008).

- **Estirpes 2ACAP e 21 CAP:** isoladas pelo LZB/VPS/FMVZ/USP, do rim de capivaras abatidas no município de Piracicaba, SP, no ano de 2001, e tipificada como pertencentes ao sorogrupo Grippotyphosa, sorovar Bananal (Marvulo et al. 2002, Ahmed et al. 2006).

- **Estirpe GR6:** isolada pelo LZB/VPS/FMVZ/USP, do rim de um suíno (marrã) abatido no município de Suzano, SP, em 2003, e tipificada como pertencente ao sorogrupo Pomona, sorovar Pomona (Miraglia et al. 2008).

Os soros foram triados na diluição de 1:100, e aqueles que apresentaram 50% ou mais de aglutinação foram titulados pelo

exame de uma série de diluições geométricas de razão dois. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo. Os antígenos eram examinados ao microscópio de campo escuro, previamente aos testes, a fim de verificar a mobilidade e a presença de auto-aglutinação ou de contaminantes.

O sorovar mais provável foi o que apresentou maior título. Quando um animal apresentou título mais elevado idêntico para dois ou mais sorovares o mesmo foi descartado desta análise (Vasconcellos et al. 1997). O resultado da SAM foi inserido em um banco de dados com o emprego do software Microsoft Access®.

A comparação das proporções de animais soropositivos entre as duas coleções de antígenos foi efetuada pelo teste de McNemar para amostras relacionadas (Zar 1999), com nível de significância de 5%, utilizando o programa SPSS for Windows versão 12.0.

RESULTADOS

Das 9820 fêmeas bovinas em idade de procriar examinadas, 5806 (59,12%) foram reagentes na SAM para pelo menos um sorovar com a coleção de 23 sorovares de referência com títulos variando de 100 a 12800 (Quadro 1). Com a adição das dez estirpes autóctones houve 6400 (65,17%) animais reagentes com títulos variando de 100 a 12800, portanto, a coleção de antígenos ampliada propiciou um aumento de 594 animais (6%) classificados como não reagentes pela coleção de referência.

As proporções de animais reatores para leptospirose por estado com a coleção de 23 antígenos de referência variaram de 41,15% a 78,80% e com a coleção de 23 antígenos de referência acrescida de dez estirpes autóctones variaram de 43,69 a 79,26% (Quadro 1). A proporção de animais reatores em todos os estados com a coleção de 23 sorovares de referência foi de 59,12 e com a coleção de 23 sorovares de referência acrescida de dez estirpes autóctones foi de 65,17. Esta diferença foi significativa ($p=0,001$). O único Estado em que não houve diferença significativa na comparação das proporções de animais soropositivos entre as duas coleções de antígenos foi o de Santa Catarina ($p=0,522$).

Dos 9820 animais examinados, descontadas as reações empatadas para dois ou mais sorovares, foram aproveitadas 3876 reações obtidas com a coleção de 23 antígenos de

Quadro 1. Fêmeas bovinas em idade reprodutiva submetidas ao teste de soroaglutinação microscópica aplicado ao diagnóstico da leptospirose com uma coleção de 23 sorovares de referência e com a coleção de 23 sorovares de referência acrescida de dez estirpes autóctones, segundo o estado de origem e a natureza do resultado obtido para qualquer sorovar

Estado	Coleção 23 antígenos de referência		Coleção 23 antígenos de referência e dez autóctones		Valor de p
	Proporção	%	Proporção	%	
Goiás	1102/1741	63,30	1203/1741	69,10	0,001
Mato Grosso	743/1186	62,65	895/1186	75,46	0,004
Mato Grosso do Sul	740/995	74,37	812/995	81,61	0,000
Minas Gerais	986/1615	61,05	1073/1615	66,44	0,001
Paraná	681/1655	41,15	723/1655	43,69	0,000
Rio Grande do Sul	378/748	50,53	387/748	51,74	0,000
São Paulo	1005/1663	60,43	1135/1663	68,25	0,001
Santa Catarina	171/217	78,80	172/217	79,26	0,522
TOTAL	5806/9820	59,12	6400/9820	65,17	0,001

referência e 4388 com a coleção ampliada pelos antígenos de estirpes autóctones. Os cinco sorovares mais prováveis identificados por animal com a coleção de 23 sorovares de referência foram em ordem decrescente de ocorrência: Hardjo (43,03%), Shermani (20%), Wolffi (9,96%), Grippothyphosa (5,42%) e Pomona (4,28%). Com a coleção ampliada por dez estirpes isoladas no Brasil, os cinco sorovares mais prováveis foram: Hardjo (31%), Guaricura - M4/84 (22,50%), Shermani (15,43%), Wolffi (4,76%), Grippothyphosa (3,71%) e Autumnalis (3,24%) (Quadro 2).

As proporções dos três sorovares de leptospiros mais prováveis identificados pela SAM por Estado são apresentadas no Quadro 3. Os sorovares mais prevalentes com a coleção de 23 sorovares de referência, em ordem de ocorrência, foram Hardjo, Shermani e Wolffi (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e São Paulo). No Rio Grande do Sul a distribuição encontrada foi Hardjo, Australis e Shermani, e em Santa Catarina, Hardjo, Shermani e Pomona. Com a coleção de antígenos ampliada por dez estirpes autóctones, em ordem de ocorrência, os sorovares mais frequentes foram Guaricura, Hardjo e Shermani (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Hardjo, Guaricura e Shermani (São Paulo), Hardjo, Shermani e Guaricura (Goiás e Minas Gerais), Hardjo, Shermani e Autumnalis (Para-

Quadro 2. Sorovares de *Leptospira* spp. mais prováveis identificados em inquérito sorológico efetuado pelo teste da SAM em 9820 fêmeas bovinas procedentes de 109 propriedades distribuídas em oito estados brasileiros segundo a coleção de antígenos empregada

Sorovar	Coleção 23 antígenos de referência		Coleção 23 antígenos de referência e dez autóctones	
	Proporção	%	Proporção	%
Australis	102/3876	2,63	100/4388	2,28
Bratislava	78/3876	2,01	70/4388	1,60
Autumnalis	161/3876	4,15	142/4388	3,24
Butembo	17/3876	0,44	15/4388	0,34
Castellonis	36/3876	0,93	32/4388	0,73
Bataviae	1/3876	0,03	1/4388	0,02
Canicola	23/3876	0,59	6/4388	0,14
Witcombi	16/3876	0,41	14/4388	0,32
Grippythyposa	210/3876	5,42	163/4388	3,71
Hebdomadis	62/3876	1,60	39/4388	0,89
Copenhageni	14/3876	0,36	11/4388	0,25
Icterohaemorrhagiae	47/3876	1,21	35/4388	0,80
Panamá	8/3876	0,21	8/4388	0,18
Pomona	166/3876	4,28	105/4388	2,39
Pyrogenes	75/3876	1,94	59/4388	1,34
Hardjo	1668/3876	43,03	1360/4388	31,00
Wolffi	386/3876	9,96	209/4388	4,76
Shermani	775/3876	20,00	677/4388	15,43
Tarassovi	24/3876	0,62	23/4388	0,52
Patoc	7/3876	0,18	5/4388	0,11
Grippythyposa (2ACAP)	14/4385	0,32
Grippythyposa (21CAP)	19/4388	0,43
Brasiliensis	1/4388	0,02
Pomona (GR6)	14/4388	0,32
Canicola (L01)	21/4388	0,48
Canicola (L04)	43/4388	0,98
Canicola (L014)	122/4388	2,78
Guaricura	986/4388	22,50
Pomona (M7/87)	81/4388	1,85
Copenhageni (M9/99)	13/4388	0,30
TOTAL	3876/3876	100	4388/4388	100

Quadro 3. Sorovares de *Leptospira* spp. mais prováveis identificados em inquérito sorológico efetuado pelo teste da SAM em 9820 fêmeas bovinas procedentes de 109 propriedades distribuídas em oito estados brasileiros segundo a coleção de antígenos empregada e a Unidade Federativa

Estado	Coleção 23 antígenos de referência		Coleção 23 antígenos de referência e dez autóctones	
	Sorovares	%	Sorovares	%
Goiás	Hardjo	47,97	Hardjo	40,28
	Shermani	18,80	Shermani	14,81
	Wolffi	8,24	Guaricura	8,88
Mato Grosso	Hardjo	33,12	Guaricura	48,55
	Shermani	17,72	Hardjo	15,47
	Wolffi	17,09	Shermani	9,95
Mato Grosso do Sul	Hardjo	44,33	Guaricura	35,40
	Shermani	25,63	Hardjo	28,44
	Wolffi	16,02	Shermani	16,76
Minas Gerais	Hardjo	49,29	Hardjo	38,77
	Shermani	18,50	Shermani	16,58
	Wolffi	7,91	Guaricura	14,30
Paraná	Hardjo	28,84	Hardjo	25,77
	Shermani	21,81	Shermani	19,38
	Wolffi	7,28	Autumnalis	14,98
Rio Grande do Sul	Hardjo	32,79	Hardjo	25,69
	Australis	14,34	Australis	14,23
	Shermani	10,66	Shermani	9,09
São Paulo	Hardjo	49,15	Hardjo	31,00
	Shermani	23,73	Guaricura	30,51
	Wolffi	9,18	Shermani	17,52
Santa Catarina	Hardjo	46,02	Hardjo	46,79
	Shermani	20,35	Shermani	21,10
	Pomona	14,18	Grippythyposa	11,01

ná), Hardjo, Shermani e Grippythyposa (Santa Catarina), e Hardjo, Australis e Shermani (Rio Grande do Sul).

DISCUSSÃO

O emprego da SAM para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em 9820 bovinos fêmeas em idade reprodutiva, originários de 109 propriedades distribuídas em oito Estados brasileiros, com uma coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes de leptospiros autóctones permitiu a detecção de um maior número de animais positivos que o obtido com os 23 sorovares de referência. Quando as estirpes isoladas locais foram introduzidas na coleção de antígenos da SAM, foram detectados animais reagentes que teriam sido negativos com a coleção de referência (Brod et al. 2005).

O único estado onde as proporções de animais soropositivos não foram estatisticamente diferentes foi Santa Catarina, contudo, o número de propriedades examinadas neste Estado foi inferior ao dos demais. Valores no incremento da sensibilidade da SAM com o emprego de estirpes autóctones semelhantes aos obtidos no presente estudo foram encontrados por Araújo et al. (2005), de 4%, em bovinos de Minas Gerais, com o emprego da estirpe Norma do sorovar Hardjo; por Dias et al. (2006), de 6,8%, em bovinos do Rio Grande do Sul, com as estirpes Tande do sorovar Canicola e Caco ED1 da espécie *L. noguchi*; por Hermann et al. (2004), de 6,39%, em ovinos com a estirpe Norma, do sorovar Hardjo; e por Oliveira (2005), de 5,88%, em cães de Londrina, Paraná, com a estirpe L01 do sorovar Canico-

la. Tais diferenças podem ser atribuídas a fatores regionais, tais como a localização do isolamento da estirpe autóctone, e também a fatores sazonais, relacionados a época do ano em que foram efetuadas as colheitas de sangue (Faine 1982, Seyffert et al. 2004).

Tanto com a coleção de 23 sorovares de referência, como com a coleção ampliada por dez estirpes locais isoladas no Brasil, o sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) foi o mais frequente, porém a estirpe autóctone Guaricura, do sorogrupo Sejroe, o mesmo em que estão incluídos os sorovares Hardjo e Wolffi, foi a segunda com maior número de reatores. Este resultado sugere a existência de reações cruzadas entre os representantes do mesmo sorogrupo e inclusive a possível presença da estirpe autóctone Guaricura em pelo menos 27 (24,77%) das 109 propriedades trabalhadas. A confirmação definitiva só poderá ser de fato esclarecida com novas investigações que empreguem o isolamento e a tipificação de amostras.

Destacam-se ainda os resultados obtidos nas propriedades oito e 77, onde o sorovar mais provável com a coleção ampliada foi a estirpe L014 do sorovar Canicola. Esta estirpe isolada de rim de bovinos no Estado do Paraná (Zacarias et al. 2008) poderia estar ocorrendo em outros Estados do país. Estes resultados sugerem a existência de um possível ciclo de transmissão envolvendo bovinos e cães.

No conjunto de animais examinados, os três sorovares mais prováveis observados com a coleção de antígenos de referência foram, em ordem de ocorrência, Hardjo, Shermani e Wolffi. Destes apenas o sorovar Hardjo já foi isolado e tipificado no Brasil (Moreira 1994). O sorovar Wolffi só foi isolado no Brasil de roedores silvestres (*Akodon arviculoides*) (Correa et al. 1965/1967), camundongo (*Mus musculus*) (Giorgi et al. 1984) e de seres humanos (Correa et al. 1965/1967), porém nunca foi encontrado em bovinos. O sorovar Shermani nunca foi isolado no Brasil. As reações para o sorovar Shermani também poderiam ser consideradas como paradoxais, ou seja, títulos mais elevados para sorovar diferente do infectante (Turner 1968). Contudo, em Rondônia, Aguiar et al. (2006) constatou que o sorovar Shermani foi o terceiro mais frequente, precedido pelos sorovares Hardjo e Wolffi.

Com a coleção de antígenos ampliada por dez estirpes autóctones houve uma alteração no perfil dos sorovares mais prováveis encontrados no conjunto de animais examinados. A segunda posição passou a ser ocupada pela estirpe M4/84 do sorovar Guaricura, estirpe autóctone originalmente isolada por Santa Rosa et al. (1980) em bovinos do Estado de São Paulo, e posteriormente por Vasconcellos et al. (2001) em búfalas no Vale da Ribeira, SP. Esta constatação sugere a ocorrência de reações cruzadas entre os sorovares Hardjo e Guaricura que só poderão ser esclarecidas por novas investigações com isolamento e tipificação.

Pela análise dos dados pode-se verificar o comportamento das estirpes do sorovar Canicola empregadas no presente estudo. Com a estirpe de referência houve apenas 23 animais (0,59%) em que o sorovar Canicola foi o mais provável, contudo com a inclusão de três estirpes autóctones deste sorovar, L01, L04 e L014, isoladas em Londrina, Paraná, respectivamente de cão, suíno e bovino, o número de animais reatores passou a ser de 186 (4,24%). Houve,

portanto, um aumento de 163 animais. A estirpe mais frequente dentre as três autóctones empregadas foi a L014 que contou com 122 animais reagentes (2,78%). Esta estirpe foi isolada do rim de bovinos em abatedouro, do Estado do Paraná (Zacarias et al. 2008).

A predominância do sorovar Guaricura em cinco estados dos oito estudados (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo) e a pequena ocorrência nos Estados do Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) sugere a possível existência de influências climáticas ou mesmo de diferenças na suscetibilidade das raças ou linhagens de animais exploradas em tais Estados. De fato o clima predominante nos estados do sul é o temperado, enquanto no sudeste e centro-oeste é o sub-tropical e as raças exploradas no sul são predominantemente européias, enquanto no centro-oeste e sudeste predominam os cruzamentos com raças zebuínas.

As proporções de 59,12% de animais sororeatores para leptospirose em todas as propriedades examinadas com a coleção de 23 sorovares de leptospira de referência e de 65,2% com a coleção de 23 antígenos de referência e dez estirpes isoladas no Brasil encontradas no presente trabalho foram próximas aos resultados obtidos em outros estudos conduzidos no Brasil e confirmam a elevada taxa de infecção por leptospirose no rebanho bovino e destacam a importância em saúde animal desta zoonose.

CONCLUSÕES

A inclusão de dez estirpes de leptospirose autóctones, dos sorovares Bananal, Brasilensis, Canicola, Copenhageni, Guaricura e Pomona, isoladas de diversas espécies de animais no Brasil, na coleção de 23 antígenos de referência, empregados na reação de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos de bovinos de oito Estados Brasileiros alterou o perfil epidemiológico da zoonose; pois houve um aumento significativo do número de bovinos identificados como reatores, bem como da frequência e distribuição dos sorovares mais prováveis.

A estirpe M4/98 do sorogrupo Sejroe, sorovar Guaricura, isolada de bovinos e bubalinos do Estado de São Paulo, foi a que mais se destacou com maior frequência e intensidade de reações adicionais, particularmente nos rebanhos dos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Agradecimentos. - À equipe de campo da Pfizer que efetuou as colheitas de soro: Ulisses Ribeiro, Alécio Costa, Rafael do Amaral Martins, Alcidez Cabral de Menezes Junior, José Estenio Batista Adegas, Marcos Alberto Vieira, André Vinhas, Luiz Augusto Ismael Sapede, Enoch, Adriano Hugues de Souza, Delamar Macedo, Aduauto Sakashita, João Carlos Dassie, Marcelo Costa, Claudemar Gameiro, Luciana Sekito de Freitas, Dalton Cevolo, Carlos Sérgio Marques, Gismério Clemente Vilella, Lupércio de Antonio Junior, Olydes Barbarini Júnior e Fernanda Hoe. À Jucélia de Jesus Pereira pela confecção do mapa georreferenciado. Ao Prof. Dr. Júlio César de Freitas pelo fornecimento das estirpes: L01; L04 e L014.

REFERÊNCIAS

Aguiar D.M., Gennari S.M., Cavalcante G.T., Labruna M.B., Vasconcellos S.A., Rodrigues A.A.R., Moraes Z.M. & Camargo L.M.A. 2006. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. *Pesq. Vet. Bras.* 26(2):102-104.

- Ahmed N., Manjulata D.S., Valverde M., Vijayachari P., Machang R.S., Ellis W.A. & Hartskeerl R.A. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5(28):1-10.
- Araujo V.E.M., Moreira E.C., Naveda L.A.B., Silva J.A. & Contreras R.L. 2005. Freqüência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57(4):430-435.
- Brod C.S., Aleixo J.A.G., Jouglard S.D.D., Fernandes C.P.H., Teixeira J.L.R. & Dellagostin O.A. 2005. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 38(4):294-300.
- Cole J.R., Sulzer C.R. & Pulsely P.R. 1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. *Appl. Microbiol.* 25(6):976-980.
- Correa M.O., Hyakutake S., Natale V., Galvão P.A.A. & Aguiar H.A. 1965/1967. Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. *Revta Inst. Adolfo Lutz* 25/27:11-25.
- Correa S.H.R., Vasconcellos S.A., Morais Z.M., Teixeira A.A., Dias R.A., Barros M.A., Guimarães V., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2004. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41:189-193.
- Côrtes J.A. 1993. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose. *Anais 3º Encontro Nacional em Leptospirose*, Rio de Janeiro, p.53-57.
- Delbem A.C.B., Freitas J.C., Bracarense A.P.F.R.L., Müller E.E. & Oliveira R.C. 2002. Leptospirosis in slaughtered sows: Serological and histopathological investigation. *Braz. J. Microbiol.* 33:174-177.
- Dias F.E.F., Aoki S.M., Mesquita L.G., Nunes C.M. & Garcia J.F. 2006. Detecção de *Leptospira pomona* em sêmen bovino por eletroforese capilar fluorescente. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43(3):394-399.
- Fagundes M.Q., Seixas F.K., Hartwig D., Silva E., Grassmann A.A. & Dellagostin O.A. 2008. Tipificação de isolados de *Leptospira* pela análise de VNTR (número variável de repetições em tandem) através da eletroforese capilar. *Anais 27º Congresso de Iniciação Científica*, Pelotas, RS.
- Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Medisci, Melbourne. 296p.
- Faine S. 1982. Guidelines for the Control of Leptospirosis. World Health Organization, Geneva. 171p.
- Freitas J.C., Silva F.G., Oliveira R.C., Delbem A.C.B., Müller E.E., Alves L.A. & Teles P.S. 2004. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. *Ciência Rural* 34(3):853-856.
- Galton M.M., Sulzer C.R., Santa Rosa C.A. & Fields M.J. 1965. Application of microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Appl. Microbiol.* 13(1):81-85.
- Giorgi W., Genovez M.E., Teruya J.M. & Silva A.S. 1984. *Leptospira interrogans*, sorotipo *Wolffi*, isolada de camundongo capturado no porto de Santos, SP. *Biológico*, São Paulo, 50(12):295-297.
- Herrmann G.P., Lage A.P., Moreira E.C., Haddad J.P., Resende J.R., Rodrigues R.O. & Leite R.C. 2004. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 34(2):443-448.
- Marvulo M.F.V., Paula C.D., Ferreira P.M., Morais Z.M., Delbem A.C.B., Favero A.C.M., Miraglia F., Castro V., Genovez M.E., Ferraz E., Penteadó M., Ferreira Neto J.S., Ferreira F. & Vasconcellos S.A. 2002. Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. *International Leptospirosis Society*, Bridgetown, p.62.
- Miraglia F., Moreno A.M., Gomes C.R., Paixão R., Liuson E., Morais Z.M., Maiorka P.C., Seixas F.K., Dellagostin O.A. & Vasconcellos S.A. 2008. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* form pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 39:501-507.
- Moreira E.C. 1994. Avaliação dos métodos para erradicação de leptospirose em bovinos leiteiros. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 94p.
- Oliveira R.C., Freitas J.C., Silva F.G., Souza E.M., Delbem A.C.B., Alves L.A., Müller E.E., Balarim M.S., Reis A.C.F., Batista T.N. & Vasconcellos S.A. 2005. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, 72(1):111-113.
- Oliveira R.C. 2005. Utilização de estirpe regional na prova de soroprevalência microscópica para a leptospirose canina. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 78p.
- Santa Rosa C.A., Sulzer C.R. & Castro A.F.P. 1972. A new Leptospiral Serotype in the Bataviae Group, Isolated in São Paulo, Brazil. *Am. J. Vet. Res.* 33(8):1719-1721.
- Santa Rosa C.A., Sulzer C.R., Castro A.F.P., Yanaguita R.M. & Giorgi W. 1980. Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis group isolated from cattle in Brazil. *Int. J. Zoonoses* 7:158-163.
- Seyffert N., Bermudez V.L., Recuero A., Bourscheidt D. & Brod C.S. 2004. Importância do uso de isolados locais de leptospirose na detecção de anticorpos em humanos suspeitos de leptospirose. *Anais 13º Congresso de Iniciação Científica*, Pelotas, RS.
- Turner L.H. 1968. Leptospirosis II. Serology. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62:880-899.
- Vasconcellos S.A., Barbarini Júnior O., Umehara O., Morais Z.M., Cortez A., Pinheiro S.R., Ferreira F., Favero A.C.M. & Ferreira Neto J.S. 1997. 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, no período de janeiro a abril de 1996. *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, 64(2):7-15.
- Vasconcellos S.A., Oliveira J.C.F., Morais Z.M., Baruselli P.S., Amaral R., Pinheiro S.R., Ferreira F., Ferreira Neto J.S., Schouberg A. & Hartskeerl R.A. 2001. Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 32:298-300.
- Zacarias F.G.S., Vasconcellos S.A., Anzai E.K., Giraldo N., Freitas J.C. & Hartskeerl R. 2008. Isolation of leptospira serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Paraná, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 39:744-748.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River. 663p.